

DECOLORACIÓN DE CD2 (CAFÉ DIRECTO 2) POR ENZIMAS INTRACELULARES Y EXTRACELULARES DE *Trametes versicolor*

Maribel Cano, Myrna Solís, Aída Solís, Octavio Loera, Herminia I. Pérez
y Ma. Maura Margarita Teutli

RESUMEN

La contaminación por colorantes textiles representa un problema ecológico a nivel mundial. En el presente trabajo se mostró que es posible la decoloración del Café Directo 2 (CD2) por medio de extractos crudos de enzimas intracelulares y extracelulares, así como de la biomasa fúngica de *Trametes versicolor* cultivado en medio líquido con inductores metálicos en su forma viable. La experimentación se efectuó a temperatura ambiente, a 800rpm y con un pH inicial de 4,5; la actividad de lacasa se determinó en cada uno de los extractos. El porcentaje de decoloración se determinó por espectrofotometría UV-Visible. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados evidenciaron una decoloración total del CD2 con 50mg-l⁻¹ después de 88h, utilizando enzimas extracelulares como lacasa, lignina fúngica y manganeso peróxidasa; mientras que con la biomasa micelial activa, la decoloración total se alcanzó después de 3h para una concentración inicial de 100mg-l⁻¹ de CD2. Se encontró que la remoción de CD2 con micelio es comparable o superior a la eficiencia de remoción reportada por los métodos de inmovilización con *Phanerochaete chrysosporium*.

Introducción

La contaminación ambiental ocasionada por los colorantes azo y bencidínicos no agotados en el proceso de tinción tiene como consecuencia el deterioro de ecosistemas y problemas de salud pública (Hao *et al.*, 2000; Birhanli y Yesilada, 2006). Los métodos fisicoquímicos convencionales para el tratamiento de este tipo de efluentes, difícilmente logran la remoción completa de los colorantes en una sola etapa, lo que conlleva a un tratamiento posterior, incrementándose sus costos; además algunos subproductos generados pueden tener mayor toxicidad que la del propio colorante

(Kandelbauer *et al.*, 2004). La industria textil es una de las manufactureras que más contamina al medio ambiente, ya sea a través de sus efluentes depositarios de colorantes y subproductos potencialmente tóxicos y cancerígenos, o al provocar desequilibrios ecológicos (Wuhrmann *et al.*, 1980; Binupriya *et al.*, 2008). Lo anterior ha ocasionado que la descarga de estos efluentes se convierta en uno de los problemas de contaminación severa a nivel mundial (dos Santos *et al.*, 2007).

El Café Directo 2 (CD2) es una molécula que contiene un núcleo de bencidina (4,4 diaminodifenil) y dos grupos azo (Figura 1). La presencia de dos grupos sulfónicos en

su estructura química permite que sea completamente soluble en agua. Asimismo, es un colorante prohibido por su elevada toxicidad y por contener bencidina, la cual es carcinogénica de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA, 2010). Sin embargo, hay muchos países que continúan utilizando colorantes bencidínicos con enlaces azo; tal es el caso de México, India y Tailandia (Joseph y Somashekar, 2000; Pazarlioglu *et al.*, 2005). Algunas tecnologías aplicadas para tratar efluentes textiles conteniendo CD2 son la oxidación avanzada (Perkowski y Kos, 2003) y la oxidación térmica (Odochian *et al.*, 2007), procesos que tienen como incon-

veniente el empleo de equipos costosos. Por otro lado, los tratamientos anaerobios con lodos activados (Isik, 2004; Isik y Sponza, 2005, 2007), requieren tiempos de retención de hasta 90 días.

Los hongos de pudrición blanca tales como el *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, entre otros, han sido estudiados como agentes para la degradación de colorantes sintéticos (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006). Estos hongos producen enzimas extracelulares como la lignina peróxidasa, manganeso peróxidasa y lacasa, las cuales son capaces de oxidar compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos (Grgic y Perih, 2003; dos Santos *et*

PALABRAS CLAVE / Colorantes Textiles / Hongos Ligninolíticos / Enzimas Intracelulares /

Recibido: 31/04/2011. Modificado: 09/03/2012. Aceptado: 12/03/2012.

Maribel Cano. Ingeniera Química, Maestra en Ingeniería Química y candidata a Doctor en Biotecnología Avanzada, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN), México. Profesora, Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, México. e-mail: maribel_cano@hotmail.com

Myrna Solís. Ingeniera Química y Maestra en Administración y Doctora en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), México. Profesora, CIBA-IPN, México.

Aída Solís O. Doctora en Ciencias Biológicas, UAM, México. Profesora Investigadora, UAM, México. Dirección: Departamento de Sistemas Biológicos, UAM, Xochi-

milco. Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán. 04960 México, D.F., México. e-mail: asolis@correo.xoc.uam.mx

Octavio Loera. Doctor en Bioquímica y Biología Molecular de Hongos, Manchester University, RU. Profesor Investigador, UAM, México.

Herminia I. Pérez. Doctora en Ciencias Biológicas, UAM,

México. Profesora Investigadora, UAM, Xochimilco, México.

Ma. Maura Margarita Teutli. Doctora en Ciencias, UAM, México. Profesora Investigadora, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

DECOLORATION OF DB2 (DIRECT BROWN 2) BY INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR ENZYME FROM *Trametes versicolor*

Maribel Cano, Myrna Solís, Aída Solís, Octavio Loera, Herminia I. Pérez and Ma. Maura Margarita Teutli

SUMMARY

Textile dyes contamination represent a global environmental problem. In this paper it is shown that discoloration of Direct Brown 2 (DB2) can be obtained using crude extracts of intracellular and extracellular enzymes and fungal biomass from *Trametes versicolor* cultured in liquid media with metallic inductors in its viable form. The experimental series were run at room temperature, 800 rpm and initial pH 4.5. Laccase activity was determined in each of the extracts. The discoloration percentage was determined by UV-Visible spectrophotometry.

Assays were performed by triplicate. The use of extracellular enzymes such as laccase, lignin and manganese peroxidase led to the total discoloration of 50mg·l⁻¹ of DB2, after 88h; while the use of active mycelial biomass, allowed reaching a total discoloration after 3h for an initial DB2 concentration of 100mg·l⁻¹. It was found that DB2 removal efficiency with mycelia is comparable or higher than the one reported with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*.

DESCOLORAÇÃO DO CD2 (CAFÉ DIRETO 2) POR ENZIMAS INTRACELULARES E EXTRACELULARES DO *Trametes versicolor*

Maribel Cano, Myrna Solís, Aída Solís, Octavio Loera, Herminia I. Pérez e Ma. Maura Margarita Teutli

RESUMO

A poluição por corantes têxteis representa um problema ecológico à nível mundial. Nesse trabalho foi mostrado-se que é possível a descoloração do Café Direto 2 (CD2) por meio de extratos de enzimas intracelulares e extracelulares, bem como da biomassa fungicida de *Trametes versicolor* cultivados em meio líquido com indutores de metal in situ. Os testes foram realizados à temperatura ambiente, a 800 rpm e com um pH inicial de 4,5. A atividade da lacasa determinou-se para cada um dos extratos e a porcentagem de descoloração determinou-se por espectrofotometria UV-Visível.

Todos os testes foram realizados por triplicado. Os resultados evidenciaram uma descoloração total do CD2 com 50mg l⁻¹ após 88h usando enzimas extracelulares como a lacasa, a lignina peroxidase e manganês peroxidase, enquanto que com a biomassa micelal ativa a descoloração total alcançou-se após 3h para uma concentração inicial de 100mg l⁻¹ do CD2. Encontrou-se que a remoção de CD2 com micélio é comparável ou superior à eficiência de remoção reportada por métodos de imobilização por *Phanerochaete chrysosporium*.

al., 2007). Esta característica ha sido aprovechada para ser empleada en el tratamiento de aguas contaminadas por la industria textil.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar extractos crudos y biomasa fúngica para la remoción del CD2, discriminando entre enzimas intracelulares, extracelulares y asociadas.

Materiales y Métodos

Reactivos

En la preparación de medios se utilizó CaCl₂, MnSO₄·H₂O, CuSO₄·5H₂O y ABTS (ácido 2',2' azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico]), todos de grado reactivo. El extracto de malta, de soya, dextrosa y agar papa dextrosa (PDA) fueron de la compañía Bioxón. El CD2 (CAS 2429825), se adquirió a la empresa Dalaquimia, y su pureza corresponde al grado industrial.

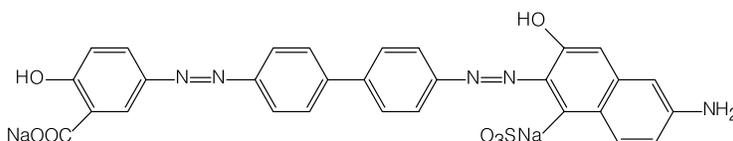


Figura 1. Estructura química del CD2

Cepa

Las cepa pura de *Trametes versicolor* (Tv) fue proporcionada por Rafael Vázquez-Duhalt, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México.

Medio de cultivo para la preservación del hongo

El *Trametes versicolor* fue preservado en un medio complejo sólido, preparado con la composición indicada en la Tabla I, esterilizado a 121°C y 15psi durante 15min, y posteriormente vertido en cajas de Petri. La inoculación se realizó cortando con bisturí el medio de cultivo sólido en secciones

de 1cm² y colocando el fragmento en la parte central de cada caja preparada; los cultivos se incubaron a 30°C por 7 días. Posteriormente se mantuvieron las cajas de Petri a 4°C para uso posterior.

Selección de medio de cultivo líquido para producción de micelio

Con la finalidad de incrementar la actividad enzimática se probaron dos medios de cultivo líquidos (A y B) cuya composición es:

Medio con inductores de tipo metálico (medio A). Este medio se preparó con 0,05g·l⁻¹ de

cada uno de los inductores CuSO₄·5H₂O y MnSO₄·H₂O, suplementado con extracto de paja, malta y CaCl₂·2H₂O en concentraciones de 100, 20 y 0,05g·l⁻¹, respectivamente. El método seguido para la preparación del medio líquido es el reportado por Sainos *et al.* (2006).

Medio sin inductores de tipo metálico (Medio B). Esta variante de medio se preparó únicamente con extracto de paja, el cual también induce la producción de enzimas

TABLA I
COMPOSICIÓN
DEL MEDIO COMPLEJO

Sustancia	g·l ⁻¹
Extracto de levadura	3,0
Extracto de malta	3,0
Peptona de soya	5,0
Dextrosa	10,0
PDA	40,0

(Hossain, 2008), y malta en las concentraciones anteriormente descritas y siguiendo la misma metodología.

Los medios A y B fueron repartidos en ocho matraces Erlenmeyer de 500ml, esterilizados a 121°C y 15psi, durante 15min. Posteriormente se inoculó cada matraz con una sección de 1cm² del hongo (Tv), el control fue el medio de cultivo estéril sin inóculo. Los matraces inoculados se mantuvieron en incubación estática a 30°C por un periodo de 15 días. La carpeta de biomasa fúngica fue separada con pinzas estériles del medio líquido y la actividad lacasa se determinó por triplicado en el extracto crudo.

Actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente. Se preparó un volumen total de reacción de 1ml, conteniendo 100µl de amortiguador de acetatos 1M a pH 5, 700µl de agua destilada, 100µl de extracto enzimático y 100µl de sustrato ABTS 5mM. Las muestras se mezclaron suficientemente y fueron incubadas a 25°C. Se leyó cada 15s el cambio de absorbancia a 414nm, por 3min, usando un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 5, y los resultados se graficaron contra el tiempo. Para calcular la actividad lacasa se consideró el coeficiente de extinción molar del ABTS de 36000M⁻¹cm⁻¹ (Bourbonnais y Paice 1997; Jung *et al.*, 2002). Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que oxida 1µmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción.

Obtención de extractos enzimáticos

a) Enzimas intracelulares. Para la extracción de enzimas intracelulares se utilizó la biomasa fúngica cultivada en matraces Erlenmeyer de 250ml conteniendo 150ml de medio líquido A. A fin de eliminar las enzimas asociadas al micelio, cada carpeta

de biomasa fúngica se lavó con agua estéril y se secó con papel filtro; posteriormente el micelio se maceró en un mortero de porcelana y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500ml, agregando 200ml de agua estéril, y dejando en agitación orbital durante 24h a 30°C. El procedimiento de extracción se hizo por triplicado en condiciones estériles.

b) Enzimas asociadas a la carpeta de biomasa fúngica. La extracción de enzimas asociadas se realizó separando cada micelio del medio líquido y colocándolo en matraz de 500ml. A cada matraz se le adicionó 200ml de agua estéril y se dejó en agitación orbital durante 24h a 30°C. Posteriormente la biomasa fúngica fue separada y el líquido residual se utilizó como extracto crudo.

c) Mezcla de enzimas intracelulares y asociadas. Se preparó una mezcla con volúmenes iguales de los extractos de enzimas intracelulares y de las asociadas (Tabla II).

Ensayos de decoloración con extractos enzimáticos

En tubos de ensayo de 50ml se colocaron 21,42ml de cada uno de los diferentes extractos enzimáticos con 8,57ml de CD2 conteniendo 175mg·l⁻¹, volumen que corresponde a una concentración final de 50mg·l⁻¹ del colorante. Los ensayos se efectuaron a 800rpm, temperatura ambiente, y con un pH inicial de 4,5. El ajuste de pH se realizó con

ácido acético 0,2M y acetato de sodio 0,2M. Para cada bioensayo, se preparó un blanco conteniendo agua y extracto (Tabla II) en la misma proporción en volumen de colorante y extracto, como la empleada en los ensayos del CD2. La decoloración del CD2 se analizó por medio de un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453. El porcentaje de decoloración se determinó de acuerdo a la fórmula % = 100 (Abs CD2 - Abs Extracto)/Abs CD2 inicial

donde Abs CD2: absorbancia registrada del colorante a la longitud de onda de máxima absorción del CD2 (480nm), y Abs Extracto: absorbancia a 480nm de la mezcla (extracto crudo y CD2), después de un tiempo dado de reacción.

En todas las determinaciones espectrofotométricas se utilizó como cero, el blanco correspondiente a cada mezcla de reacción, el cual se preparó con extracto crudo y agua estéril en la misma proporción en volumen que en los ensayos enzimáticos con CD2. Las mediciones se realizaron a las 17, 39, 60 y 88h. Las muestras utilizadas para el análisis fueron centrifugadas a 4000rpm por 15min y el sobrenadante fue empleado para el análisis espectrofotométrico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayos con biomasa micelial

En otra serie de experimentos, la biomasa fúngica fue retirada del medio de cultivo

líquido y molida en mortero bajo condiciones estériles. Se utilizaron dos variantes: tratada térmicamente por el proceso de esterilización (a 121°C y 15psi por 15min) para desactivación de enzimas y en su forma activa, sin tratamiento térmico. Se emplearon 2, 4 y 6g·l⁻¹ de micelio molido, a los que se adicionó CD2 en una concentración de 100mg·l⁻¹. Para cada ensayo se preparó un blanco enzimático (la misma cantidad en g·l⁻¹ de micelio mezclado con agua destilada); este blanco fue utilizado como cero en las mediciones espectrofotométricas. Los ensayos se efectuaron bajo las mismas condiciones de reacción que los extractos enzimáticos, con un tiempo de reacción de 3h.

Resultados y Discusión

Efecto de inductores metálicos en la actividad lacasa

Se realizó un análisis de varianza de un factor por medio del programa estadístico de Excel®, teniendo como variable de respuesta la actividad enzimática, entre los medios líquidos preparados con y sin inductores. Los resultados de esta prueba mostraron una diferencia significativa (p>0,05) entre ambos medios, por lo que se infiere que la adición de inductores incrementó la actividad de las enzimas lacasa del medio líquido, cuya actividad fue 0,246 ±0,027U/ml, y sin inductores de sólo 0,138 ±0,025U/ml. No obstante el

Tabla II
COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN DE EXTRACTOS Y CD2

Tipo de extracto	Composición	Blanco
Extracelular (ML)	21,42ml ML + 8,57ml 175mg·l ⁻¹ CD2	5ml ML + 2ml H ₂ O
Intracelular (Int)	21,42ml Int + 8,57ml 175mg·l ⁻¹ CD2	5ml Int + 2ml H ₂ O
Asociadas (Aso)	21,42ml Aso + 8,57ml 175mg·l ⁻¹ CD2	5ml Aso + 2ml H ₂ O
Combinación (IntAso)	10,52ml Int + 10,52ml Aso + 8,57ml 175 mg ⁻¹ CD2	2,5ml Int + 2,5ml Aso + 2ml H ₂ O

medio B, cuya composición fue a base de extracto de paja y malta únicamente, funcionó también como inductor, ya que éste ha sido empleado como sustrato en la producción de enzimas ligninolíticas (García y Torres, 2003; Sainos *et al.*, 2006).

Decoloración por extractos enzimáticos y por enzimas extracelulares

En la Figura 2 se compara la remoción de color obtenida a lo largo de 88h. Como puede observarse, con las enzimas extracelulares se logró una reducción total de color; mientras que con las intracelulares fue de sólo 57,62%, y con la mezcla de intracelulares-asociadas se tuvo 51,87%. La menor reducción de color (35,61%) se obtuvo al usar solamente las asociadas a la carpeta de biomasa fúngica. En la Figura 3 puede observarse que el porcentaje de decoloración fue acorde con la actividad enzimática lacasa dado que a mayor actividad se observó una mayor decoloración, con excepción de las enzimas extracelulares, en las cuales la decoloración puede estar influenciada por la probable presencia de otro tipo de enzimas extracelulares como la MnP (Grgic y Perih, 2003).

Cabe resaltar que tanto las enzimas intracelulares como las asociadas fueron también capaces de biodegradar al CD2, de manera semejante a lo observado con otro tipo de contaminantes orgánicos y complejos enzimáticos intracelulares, como reportan Levin *et al.* (2003). Esto evidencia que las enzimas intracelulares y las asociadas al micelio pueden degradar al CD2 sin intervención de las enzimas extracelulares, contrario a lo que comúnmente se ha reportado sobre la degradación de compuestos azo (Koroleva *et al.*, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2007). Por otro lado, la combinación de enzimas intracelulares y asociadas no produjo sinergia en la

decoloración, dado que sus porcentajes de decoloración se mantuvieron en el promedio de las enzimas intracelulares y asociadas. Esto puede atribuirse a la baja actividad lacasa que presentaron las enzimas asociadas, que al combinarse con las intracelulares, de mayor actividad, redujeron la actividad total del extracto y, por lo tanto, el porcentaje de decoloración. Por otra parte, el posible mecanismo de acción de la lacasa sobre el colorante pudo haberse iniciado en los enlaces O-H y N-H de la molécula del CD2 (Figura 5), para formar radicales fenólicos y radicales amino, dado que las reacciones catalizadas por lacasas sustraen un electrón de sustratos polifenólicos para formar radicales catiónicos aromáticos (Abdulla *et al.*, 2000; Zille *et al.*, 2005).

Decoloración por biomasa fúngica

En las Figuras 4 y 6 se aprecia que la decoloración del CD2 se incrementó a medida que aumentó la concentración de micelio molido; sin embargo, la capacidad de adsorción máxima para cada concentración fue muy similar 9,97; 10,37 y 10,08mg CD2/g de micelio, en

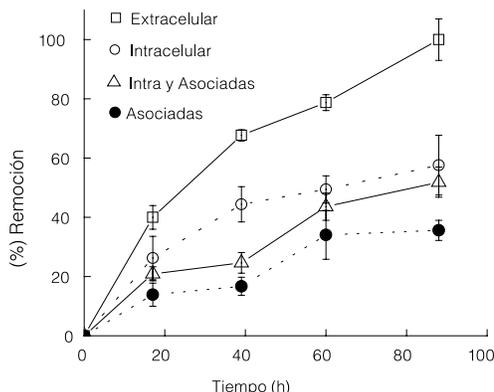


Figura 2. Porcentaje de remoción de CD2 por extractos de enzimas extracelulares, intracelulares, combinación de intracelulares-asociadas, y asociadas.

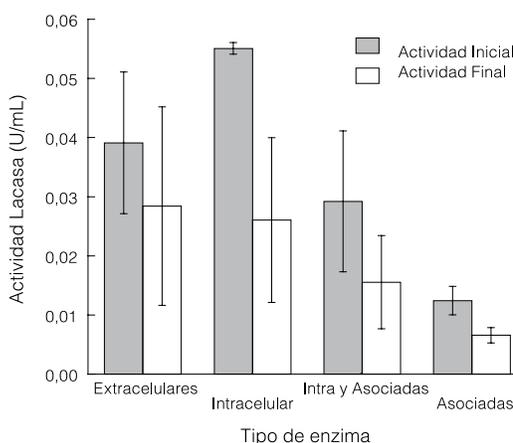


Figura 3. Actividad lacasa a pH= 4,5 al inicio y después de 4h, para las enzimas extracelulares, intracelulares, asociadas y una mezcla de las mismas.

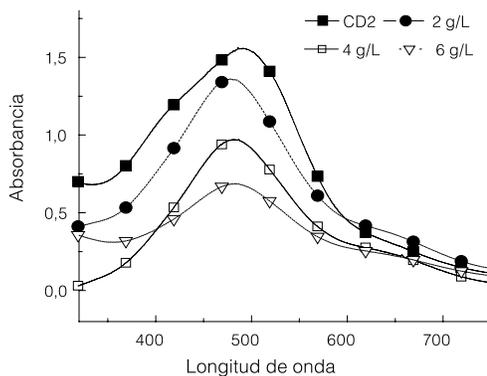


Figura 4. Decoloración del CD2 con una concentración inicial de 100mg·l⁻¹, después de 3h de contacto, distintas concentraciones de biomasa fúngica de *T. versicolor* inactivada térmicamente a 121°C y 15psi.

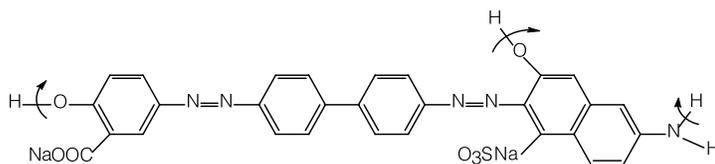


Figure 5. Posibles puntos de corte del CD2, por extractos crudos de *T.versicolor*.

3h de contacto del micelio con el colorante. La similitud en los resultados de capacidad de adsorción significa que después de la saturación del micelio con el CD2, la decoloración adicional, se debe a la acción enzimática; no obstante, la secuencia en el fenómeno de adsorción y acción enzimática, o el paralelismo entre ambos procesos, dependerá de la velocidad de adsorción y de la velocidad de reacción enzimática, las que son función de los coeficientes de transporte de masa y coeficientes cinéticos (Atkinson, 2002). Lo anterior explica que manteniendo constante la concentración de CD2, los porcentajes globales de remoción (adsorción y reacción) fueran mayores a mayor concentración de micelio, siendo la remoción global de color de 18,9; 63,2 y 94,2% para 2, 4 y 6g·l⁻¹, respectivamente. La bioadsorción de colorantes se presenta en células vivas e inactivas (Isik y Sponza, 2005), fenómeno que involucra interacciones fisicoquímicas (Pazarlioglu *et al.*, 2005) que pueden favorecer el proceso de decoloración (Selvam *et al.*, 2003). Por otro lado, Wang y Yu (1998) reportaron que la adsorción va seguida de una biodegradación del colorante adsorbido en micelio de *T. versicolor*, lo que es importante porque sugiere la acción de enzimas asociadas a la pared celular del micelio.

La combinación de enzimas intracelulares y asociadas al micelio molido activo también evidenció su capacidad de biodegradación del CD2 por acción enzimática (Figura 6), tal como se observó en la de-

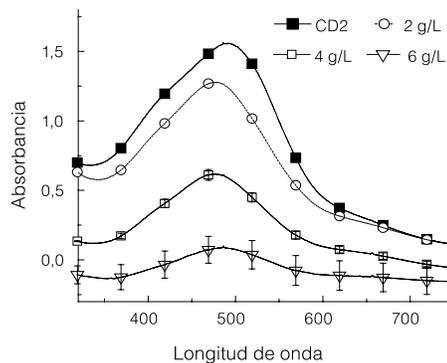


Figura 6. Decoloración del CD2 con una concentración inicial de 100mg·l⁻¹, después de 3h de contacto, por distintas concentraciones de biomasa fúngica activa de *T. versicolor*.

coloración por extractos crudos. Es importante mencionar que la adición de los efectos de adsorción y de acción enzimática logró que en 3h se obtuviera una mayor eficiencia en la remoción de color (94ppm con 6g·l⁻¹ de micelio) respecto a los métodos tradicionales ya que, por citar un ejemplo, para una solución de CD2 con 50ppm, un tratamiento con lodos activados produjo una reducción del 100% con un tiempo de retención hidráulica de 20h (Isik, 2004). Algunas modificaciones en este modelo experimental permitieron que el tiempo de retención se redujera a 6h (Isik y Sponza, 2005). En el caso de los procesos de oxidación avanzada, Perkowski y Kos (2003) utilizaron una concentración de 30mg·l⁻¹ requiriendo 2h para una oxidación total. Por su parte, la inmovilización de *Phanerochaete chrysosporium* en piedra pómez activada con ZrOCl₂ permitió una decoloración de 95-100% en un tiempo de 6 días para una concentración inicial de 120mg·l⁻¹ (Pazarlioglu et al., 2005).

Conclusiones

Las enzimas intracelulares, asociadas y extracelulares del *Trametes versicolor* tienen la capacidad de decolorar al CD2, al igual que la biomasa fúngica, ya sea

tratada térmicamente o en forma activa. La remoción del CD2 en 3h para una concentración de 100mg·l⁻¹, tuvo una mayor eficiencia que en otros estudios reportados. Los extractos crudos, así como la biomasa micelial podrían implementarse a nivel industrial sin depender de las condiciones de cultivo o de los requerimientos de los procesos de inmovilización, además de que pueden ser eficientes y económicos por la cantidad de colorante que se puede remover en tiempos menores a los reportados por otros métodos.

REFERENCIAS

Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 3357-3362.

Atkinson B (2002) *Reactores Bioquímicos*. Reverté. Barcelona, España. pp. 58-67.

Binupriya AR, Sathishkumar M, Swaminathan K, Ku CS, Yun SE (2008) Comparative studies on removal of congo red by native and modified mycelial pellets of *Trametes versicolor* in various reactor modes. *Bioresource Technol.* 99: 1080-1088.

Birhanli E, Yesilada O (2006) Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. *Enz. Microb. Technol.* 39: 1286-1293.

Bourbonnais R, Paice MG (1997) Reactives of various mediators and laccase with Kraft pulp and lignin model compound. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 4627-4632

Dávila G, Vázquez-Duhal R (2006) Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquím.* 30: 29-55.

Santos AB, Cervantes FJ, van Lier, JB (2007) Review paper on current technolo-

gies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technol.* 98: 2369-2385.

EPA (2010) www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/DCB%20Action%20Plan_06232010.noheader.pdf

García AM, Torres RG (2003) Producción de enzimas ligninolíticas por basidiomicetes mediante la técnica de fermentación de sustrato sólido. *Rev. Col. Biotechnol.* 5: 56-64.

Grgic I, Perih A (2003) Stimulation of ligninolytic enzyme production in *Phanerochaete chrysosporium* by polyxyalkanes. *J. Appl. Microbiol.* 94: 360-368.

Hao OJ, Kim H, Chang PC (2000) Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 30: 449-505.

Hossain SM, Anantharaman N (2008) Effect of wheat straw podwer on enhancement of ligninolytic enzyme activity using *Phanerochaete chrysosporium* Ind. *J. Biotechnol.* 7: 502-507.

Isik M (2004) Efficiency of simulated textile wastewater decolorization process based on the methanogenic activity of upflow anaerobic sludge blanket reactor in salt inhibition condition. *Enz. Microb. Technol.* 35: 399-404.

Isik M, Sponza DT (2005) Substrate removal kinetics in an upflow anaerobic sludge blanket reactor decolorising simulated textile wastewater. *Process Biochem.* 40: 1189-1198.

Isik M, Sponza DT (2007) Fate and toxicity of azo dye metabolites under batch long-term anaerobic incubations. *Enz. Microb. Technol.* 40: 934-939.

Joseph MA, Somashekar TH (2000) Studies on residual aryl amine content on discharged printed silk fabrics. *Colorat. Technol.* 116: 60-61.

Jung H, Xu F, Li K. (2002) Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enz. Microb. Technol.* 30: 161-168

Kandelbauer A, Maute O, Kessler RW, Erlacher A, Gubitz GM (2004) Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 87: 552-563.

Koroleva O, Stepanova EV, Gavrilova P, Yakovleva NS, Landesman EO Yavmetdinov IS, Yaropolov A (2002) Laccase

and Mn-peroxidase production by *Coriolus hirsutus* strain 075 in a jar fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 449-455.

Levin L, Papinutti L, Forchiassini F (2004) Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Biores. Technol.* 94:169-176.

Odochian L, Dulman V, Dumitras M, Pui A (2007) Study by thermal methods on the materials obtained by dye removal from waste waters with beech flour. *J. Thermal Anal. Calorim.* 89: 625-631.

Pazarlioglu NK, Urek RO, Ergun F (2005) Biodecolorization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 40: 1923-1929.

Perkowski J, Kos L (2003) Decoloration of model dyehouse wastewater with advanced oxidation processes. *Fibr. Text. East. Eur.* 11: 67-71.

Sainos E, Díaz G, Montiel-González, AM, Loera O, Sánchez C (2006) Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 812-815.

Selvam K, Swaminathan K, Keon-Sang Chae K (2003) Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technol.* 88: 115-119.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22: 161-187.

Wang Y, Yu J (1998) Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Water Sci. Technol.* 38: 233-238.

Wuhrmann K, Mechsner K, Kappeler T (1980) Investigation on rate-determining factors in microbial reduction of azo dyes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 325-338.

Zille A, Go'rnaacka B, Rehorek A, Cavaco-Paulo A (2005). Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 6711-6718. www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/DCB%20Action%20Plan_06232010.noheader.pdf