

CRECIMIENTO Y HABILIDAD DECOLORANTE POTENCIAL DE *HYPHOMYCETES (DEUTEROMYCETES)* DE RÍO SANTIAGO SOBRE MEDIO AGARIZADO SUPLEMENTADO CON CROMÓFOROS SINTÉTICOS

ROMINA LIBERTO¹ y MARIO C. N. SAPARRAT²

Summary: Growth and potential decolorizing ability of *Hyphomycetes (Deuteromycetes)* from Río Santiago on agar medium supplemented with synthetic chromophores. The ability of *Dictyosporium triramsum*, *Minimidochium parvum* and *Tetraploa aristata*, isolated from organic matter collected in Río Santiago (Buenos Aires Province, Argentina), to grow and decolorize agar media supplemented with different synthetic chromophores at 0.01% (w v⁻¹) was analyzed. Crystal violet and brilliant green reduced the growth of the three strains showing the highest inhibition percentages. While eosin and rose bengal did not affect *D. triramsum*, growth inhibition values superior to 50 % were observed for *M. parvum* and *T. aristata*. Congo red and neutral red inhibited growth of both *D. triramsum* and *M. parvum* in a 12-17%, but those dyes did not reduced *T. aristata* growth. *D. triramsum* and *T. aristata* were not affected by the toluidine blue dye, while *M. parvum* was inhibited by that chromophore. Methyl red only inhibited to *M. parvum* and *T. aristata*. The 3 strains tested revealed ability to decolorize the medium supplemented with methyl red and toluidine blue. *D. triramsum* decolorized also the medium with congo red and crystal violet, and *T. aristata* produced also the decolorization of the agar medium with crystal violet and neutral red. None of the fungi studied decolorized the media with brilliant green, eosin and rose bengal.

Key words: growth, decolorization, inhibition, *Hyphomycetes*, synthetic chromophores.

Resumen: Se analizó la capacidad de *Dictyosporium triramsum*, *Minimidochium parvum* y *Tetraploa aristata*, aisladas de materia orgánica colectada en Río Santiago (Provincia de Buenos Aires, Argentina), para crecer y decolorar medios agarizados y suplementados con diferentes cromóforos sintéticos al 0,01 % (p v⁻¹). Cristal violeta y verde brillante redujeron el crecimiento de las 3 cepas revelando los mayores porcentajes de inhibición. Mientras que eosina y rosa de bengala no afectaron a *D. triramsum*, valores superiores al 50 % de inhibición se observaron en *M. parvum* y *T. aristata*. Rojo congo y rojo neutral redujeron a *D. triramsum* y *M. parvum* en un 12-17 %, pero no a *T. aristata*. *D. triramsum* y *T. aristata* no resultaron afectados por azul de toluidina, mientras *M. parvum* fue inhibido por el colorante. Rojo de metilo sólo inhibió a *M. parvum* y *T. aristata*. Las 3 cepas probadas revelaron capacidad para decolorar el medio suplementado con azul de toluidina y rojo de metilo. *D. triramsum* decoloró además el medio suplementado con cristal violeta y rojo congo, y *T. aristata* el medio con cristal violeta y rojo neutral. Ninguno de los hongos estudiados decoloró los medios con eosina, rosa de bengala y verde brillante.

Palabras clave: crecimiento, decoloración, inhibición, *Hyphomycetes*, cromóforos sintéticos.

INTRODUCCIÓN

Existe un amplio espectro de cromóforos sintéticos utilizados a nivel industrial (Heinfling *et al.*, 1997). Estos cromóforos son sustancias recalcitrantes, estructuralmente heterogéneas, liberadas al ambiente en los efluentes industriales (Wong & Yu,

1999; Pointing *et al.*, 2000). Los procesos convencionales de tratamiento de efluentes a menudo fallan en removerlos. Por ello, estrategias de remediación utilizando microorganismos y/o enzimas están actualmente siendo objeto de estudio (Wong & Yu, 1999; Pointing *et al.*, 2000; Pointing & Vrijmoed, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004).

El Río Santiago recibe una considerable cantidad de efluentes industriales y crudo de petróleo que producen elevados niveles de contaminación (Romero *et al.*, 2000; 2002). Estudios previos anali-

¹ División Zoología Invertebrados, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Av. Paseo del Bosque s/n, 1900, La Plata.

² Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, 53 n° 477, 1900, La Plata.

zando la micobiota asociada al Río Santiago, han revelado una habilidad prometedora de hongos *Deuteromycetes* para transformar y mineralizar diferentes tipos de contaminantes (Cazau *et al.*, 1992a,b; Cazau, 1994; Romero *et al.*, 1998). No obstante, existe escasa información disponible sobre la habilidad de estos hongos para crecer en presencia de colorantes sintéticos y decolorarlos (Saparrat *et al.*, 2004). El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *Dictyosporium triramosum* Arambarri, Cabello & Cazau CLPS # 617, *Minimidochium parvum* Cabello, Arambarri & Cazau CLPS # 548 y *Tetraploa aristata* Berkeley et Broome CLPS # 419 (*Hyphomycetes*, *Deuteromycetes*), especies aisladas de materia orgánica colectada en Río Santiago, en medios agarizados suplementados con diferentes colorantes sintéticos representantes de cromóforos tipo azo, N/O-heterocíclico y trifenilmetano; y la capacidad de cada cepa para decolorarlos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

Se utilizaron 3 cepas CLPS (colección de cultivos del Instituto Spegazzini (UNLP) de *Hyphomycetes* (*Deuteromycetes*) aisladas de materia orgánica colectada en aguas de Río Santiago (Provincia de Buenos Aires) contaminadas con efluentes industriales y crudo de petróleo. *D. triramosum* y *T. aristata* se mantuvieron en estrías con el medio agar-harina de maíz y *M. parvum* en el medio agar-extracto de malta a 4°C.

Crecimiento y decoloración

Se evaluó el crecimiento de las cepas y su capacidad decolorante sobre el medio agarizado (2 % p v⁻¹) Czapek Dox modificado (medio basal, Saparrat *et al.*, 2002) conteniendo diferentes colorantes sintéticos. Se analizaron 8 colorantes representando grupos cromóforos tipo azo (rojo congo C.I. # 22 120 y rojo de metilo C.I. # 13 020), N/S-heterocíclico (azul de toluidina C.I. # 52 040 y rojo neutral C.I. # 50 040), O-heterocíclico (eosina Y C.I. # 45 380 y rosa de bengala C.I. # 45 440) y trifenilmetano (crystal violeta C.I. # 42 555 y verde brillante C.I. # 42 040) a una concentración de 0,01 % p v⁻¹. Soluciones acuosas de cada colorante al 1 %, esterilizadas mediante filtración (0,2 µm), se suplementaron al medio basal. Se utilizaron colorantes de grado analítico. Las placas se inocularon en el centro con discos de micelio de 6 mm de diámetro, obtenidos de cultivos sobre medio agar-harina de maíz (*D. triramosum* y *T. aristata*) o agar-extracto de malta

(*M. parvum*). El cultivo en medio basal y en presencia de cada colorante se realizó por triplicado. Las placas se incubaron en oscuridad a 25 ± 1,5 °C. Se estimó el crecimiento fúngico y su cinética considerando la extensión miceliar de la colonia, por medición del diámetro (en mm) durante 35 días de cultivo, a intervalos de 7 días. Se observaron coloración de las colonias y sus características de crecimiento. Se calculó la velocidad de crecimiento miceliar de cada cepa, estimando la pendiente de la recta de regresión lineal del diámetro de la colonia miceliar versus el tiempo, utilizando el programa Statistica Versión 6; se analizaron las diferencias significativas entre la pendiente de regresión estimada a partir de los datos de crecimiento de una cepa en cultivos suplementados con un determinado colorante y la pendiente de regresión a partir de su crecimiento en cultivos sobre medio basal mediante un análisis de regresión múltiple utilizando variables indicadoras y la corrección de Bonferroni (P < 0,01).

Se estimó el efecto de inhibición de cada colorante sobre el crecimiento fúngico analizando la pendiente de regresión lineal del crecimiento de cultivos suplementados con un colorante comparada con la pendiente de regresión del crecimiento calculada a partir del crecimiento de cultivos sobre medio basal, utilizando la siguiente fórmula: [(pendiente de regresión estimada para cultivos control sobre medio basal - pendiente de regresión estimada para cultivos suplementados con un determinado colorante)/ pendiente de regresión para cultivos control sobre medio basal] x 100.

Se evaluó el potencial de cada cepa para decolorar los cromóforos presentes en el medio agarizado a través de la visualización de halos de decoloración después de diferentes intervalos de tiempo, durante 35 días de cultivo. Se estableció una escala arbitraria de decoloración: 1. Decoloración después de 7 días de incubación. 2. Decoloración después de 14 días. 3. Decoloración después de 21 días. 4. Decoloración después de 28 días. 0. No decoloración después de 35 días de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de los diámetros de las colonias se realizó a partir del séptimo día de cultivo debido a que el crecimiento no se hizo evidente durante los primeros días después de la inoculación (fase lag; datos no mostrados). La Tabla 1 muestra el diámetro de las colonias de las 3 cepas probadas sobre medio basal (control) y en presencia de diferentes cromóforos sintéticos al 0,01% des-

Tabla 3. Efecto de diferentes cromóforos (e) sobre el crecimiento de *D. triramosum*, *M. parvum* y *T. aristata* y la capacidad decolorante de las cepas (d).

Cepa fúngica (CLPS)	<i>D. a</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
	(□)	(□)	(□)
	e ^a	e	e
ip̄ē c□ āne			
□ □			
□ cng□	□ □ □	□ □ □	□ □ □
□ ē ē □ □	□ □ ⁿ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □
□ S ēēc□ c ic□			
□ ē □ □ ina	□ □ □ □ ⁿ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □ ⁿ □
□ ne□ ā□	□ □ □ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □ ⁿ □
□ ēēc□ c ic□			
ina □	□ □ □ □ ⁿ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □ □
ā ē □ enga ā	□ □ □ □ ⁿ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □ □
ifeni□ eān□			
Ciā□ i□ēā	□ □ □ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □ □
eē □ i□□ane	□ □ □ □	□ □ □ □ □	□ □ □ □ □

^aReducción del crecimiento (%) en respuesta a la presencia del colorante, relacionándolo a cultivos control (*diferencias significativas entre la pendiente de regresión del tratamiento con el colorante versus el tratamiento control mediante un análisis de regresión múltiple utilizando variables indicadoras y la corrección de Bonferroni (P < 0,01); ⁿdiferencias no significativas); ^bsegún la escala relativa de decoloración descrita en Materiales y Métodos.

pués de 35 días de incubación. *D. triramosum* y *T. aristata* solamente evidenciaron desarrollo vegetativo con colonias de aspecto pardo/gris oscuro sobre medio basal; los cultivos de *M. parvum* con una coloración blanquecina sobre medio basal, revelaron la presencia de clamidosporas (observación microscópica). No se observaron diferencias en las características morfológicas de las colonias de las 3 cepas probadas en respuesta a su crecimiento sobre medio basal suplementado con cromóforos. Algunas colonias adquirieron una coloración diferencial respecto a cultivos control por la adsorción de los cromóforos al micelio. La Tabla 2 muestra los parámetros estadísticos de las rectas de regresión lineal entre el diámetro de las colonias de *D. triramosum*, *M. parvum* y *T. aristata* sobre medio basal (control) y en presencia de diferentes cromóforos sintéticos al 0,01 % (variable dependiente) versus el tiempo de cultivo (variable independiente). Excepto para los datos de *M. parvum* con verde brillante, las relaciones de regresión fue-

ron significativas a P < 0,01 y los valores de los coeficientes de determinación (r²) de las regresiones oscilan entre 0,40 y 0,99.

La Tabla 3 muestra el efecto inhibitorio de los colorantes sobre el crecimiento de las 3 cepas y la capacidad decolorante de las mismas. Entre los colorantes analizados, cristal violeta y verde brillante redujeron el crecimiento de las 3 cepas revelando los mayores porcentajes de inhibición. Verde de malaquita al 0,01 %, estructuralmente relacionado al verde brillante, resultó también ser tóxico al crecimiento fúngico (Pointing *et al.*, 2000). En este sentido, los colorantes sintéticos pueden ser agentes inhibidores del crecimiento, principalmente, debido a sus propiedades tóxicas o biostáticas sobre los hongos (Knapp *et al.*, 1995; Pointing *et al.*, 2000). El efecto de un colorante dado sobre el crecimiento miceliar puede variar dependiendo de la cepa; mientras que los colorantes O-heterocíclicos eosina y rosa de bengala no afectaron el crecimiento en *D. triramosum*, valores superiores al 50 % de inhibi-

ción se observaron en *M. parvum* y *T. aristata*. Rosa de bengala es considerado como un potente agente antibacteriano y fungistático (Gogna *et al.*, 1992). Rojo congo y rojo neutral redujeron a *D. triramosum* y *M. parvum* en un 12-17 %, pero no a *T. aristata*. Por otro lado, *D. triramosum* y *T. aristata* no resultaron afectados por azul de toluidina, mientras que *M. parvum* fue inhibido por el colorante. Rojo de metilo sólo inhibió a *M. parvum* y *T. aristata*. Diferentes mecanismos fúngicos pueden estar involucrados en la tolerancia de las cepas a los colorantes. Así, las melaninas y otros pigmentos extracelulares son componentes estructurales de resistencia, que protegen a los hongos frente al stress ambiental (Bell & Wheeler, 1986; Temp & Eggert, 1999). La presencia de este tipo de sustancias en *D. triramosum* y *T. aristata* (Arambarri *et al.*, 1987, 2001), podría determinar su menor sensibilidad a los cromóforos respecto a *M. parvum* (cepa no pigmentada; Cabello *et al.*, 1998).

Se observó que las cepas sólo decoloraron algunos de los cromóforos suplementados bajo las condiciones descritas. Las 3 cepas probadas revelaron capacidad para decolorar el medio suplementado con azul de toluidina y rojo de metilo. *D. triramosum* decoloró además el medio suplementado con cristal violeta y rojo congo, y *T. aristata* el medio con cristal violeta y rojo neutral. El medio suplementado con los colorantes O-heterocíclicos eosina y rosa de bengala y el trifenilmetánico verde brillante no mostró ser decolorado por ninguna de las cepas fúngicas utilizadas. Estos resultados coinciden con Gogna *et al.* (1992) y Pointing *et al.* (2000) quienes reportaron resultados negativos en estudios de test de decoloración fúngica sobre rosa de bengala y otros cromóforos recalcitrantes.

La decoloración fúngica puede involucrar adsorción miceliar y/o biotransformación (Knapp *et al.*, 1995; Wong & Yu, 1999; Pointing *et al.*, 2000; Pointing & Vrijmoed, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004). Este último mecanismo está mediado por enzimas oxidativas extracelulares (lacasas y peroxidasas) o sistemas redox asociados a membrana (Knapp *et al.*, 1995; Wong & Yu, 1999; Pointing *et al.*, 2000; Pointing & Vrijmoed, 2000; Ambrosio & Campos-Takaki, 2004). Saparrat *et al.* (2002) detectaron actividad lacasa extracelular en *M. parvum* CLPS # 548 y *T. aristata* CLPS # 419. La producción de lacasas por estos hongos con capacidad para decolorar cromóforos sugiere la probable participación de un sistema oxidativo extracelular en el proceso.

La potencial aplicación de los hongos en la remoción de cromóforos de uso industrial vertidos en efluentes se basa en la capacidad fúngica para decolorarlos (Knapp *et al.*, 1995; Pointing *et al.*, 2000; Pointing & Vrijmoed, 2000; Ambrosio & Campos-Takaki, 2004). Por ello, esta habilidad en hongos aislados de Río Santiago tiene importancia ambiental. En este sentido, los resultados de este trabajo revelan la resistencia de *Hyphomycetes*, aislados de sitios con alto grado de contaminación, a ciertos colorantes y/o su capacidad para decolorarlos, conduciendo a futuros estudios sobre decoloración y detoxificación de colorantes de uso industrial.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta N. Cabello (CIC, Instituto Spegazzini) por sus valiosas críticas y sugerencias y a la Lic. Ana M. M. Bucsinzky (CONICET), encargada del cepario CLPS (Instituto Spegazzini), por su asistencia técnica. Romina Liberto participó en este trabajo en el marco de las actividades de la Pasantía (2002-2003) otorgada por la Facultad de Cs. Naturales y Museo UNLP para realizar prácticas de laboratorio en el Instituto Spegazzini en el Proyecto Plan Incentivos UNLP (N317) "Hongos dominantes en ambientes contaminados: biodiversidad y degradación de xenobióticos". Mario C. N. Saparrat es becario postdoctoral de CONICET. Este trabajo se realizó con fondos del Proyecto PIP 2096/00 Hongos dominantes en hábitats contaminados: biodiversidad y degradación de xenobióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- AMBRÓSIO, S. T. & G. M. CAMPOS-TAKAKI. 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresour. Technol.* 91: 69-75.
- ARAMBARRI, A. M., M. N. CABELLO & A. MENGASCINI. 1987. Systematic study of the *Hyphomycetes* from Santiago River (Buenos Aires Province, Argentina). *Darwiniana* 28: 293-301.
- ARAMBARRI, A. M., M. N. CABELLO & M. C. CAZAU. 2001. *Dictyosporium triramosum*, a new *Hyphomycete* from Argentina. *Mycotaxon* 78: 185-189.
- BELL, A. A. & M. H. WHEELER. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.
- CABELLO, M. N., A. M. ARAMBARRI & M. C. CAZAU.

1998. *Minimidochium parvum*, a new species of hyphomycete from Argentina. *Mycol. Res.* 102: 383-384.
- CAZAU, M. C., M. N. CABELLO & A. M. ARAMBARRI. 1992a. *Hyphomycetes* del Rio Santiago su presencia en un hábitat con alto grado de contaminación. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 2: 55-59.
- CAZAU, M. C., G. MAZZELLI. & A. M. ARAMBARRI. 1992b. Utilización de diferentes especies de hongos como biodegradadores de hidrocarburos. *Bol. Micológico* 1-2: 79-83.
- CAZAU, M. C. 1994. Estudio ecológico de *Hyphomycetes* de Rio Santiago. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- GOGNA, E., R. VOHRA & P. SHARMA. 1992. Biodegradation of Rose bengal by *Phanerochaete chrysosporium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 58-60.
- HEINFLING, A., M. BERGBAUER & U. SZEZYK. 1997. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 261-266.
- KNAPP, J. S., P. S. NEWBY. & L. P. REECE. 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 664-668.
- POINTING, S. B., V. V. C. BUCHER & L. L. P. VRIJMOED. 2000. Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 199-205.
- POINTING, S. B. & L. L. P. VRIJMOED. 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 317-318.
- RODRÍGUEZ, E., O. NUERO, F. GUILLÉN, A. T. MARTÍNEZ & M. J. MARTÍNEZ. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* 36: 909-916.
- ROMERO, M. C., M. L. SALVIOLI, M. C. CAZAU & A. M. ARAMBARRI. 1998 Fungal biotransformation of pyrene. *Proc. Workshop-Bericht on Bioremediation of Polluted Areas* 18: 76-81/184-189.
- ROMERO, M. C., M. GATTI, S. CÓRDOBA, M. C. CAZAU & A. M. ARAMBARRI. 2000. Physiological and morphological characteristics of yeast isolated from waste oil effluents. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 683-686.
- ROMERO, M. C., M. L. SALVIOLI, M. C. CAZAU & A. M. ARAMBARRI. 2002. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environ. Pollut.* 117: 159-163.
- SAPARRAT, M. C. N., M. J. MARTÍNEZ, M. N. CABELLO & A. M. ARAMBARRI. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista. Iberoam. Micología* 19: 181-185.
- SAPARRAT, M. C. N., E. HAMMER & A. M. ARAMBARRI. 2004. Decolorization of synthetic dyes by the *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain (Deuteromycetes). *Biocell* 28 (Suppl.): 53.
- TEMP, U. & C. EGGERT. 1999. Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 389-395.
- WONG, Y. & J. YU. 1999. Laccase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 33: 3512-3520.

Recibido el 31 de Marzo de 2005, aceptado el 23 de Junio de 2005.