

Evaluación del crecimiento micelial de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel en medios suplementados con cobre (II) y vinaza de caña de azúcar

Rosa Elena Caballero, Mónica Miranda, Víctor Jiménez, Pedro González & Tina Hofmann
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Chiriquí, 0427, Panamá.

Resumen

Correspondencia
RE. Caballero
E-mail: rosa.caballero@unachi.ac.pa

Recibido: 30 mayo 2018

Aceptado: 18 diciembre 2018

Publicado on-line: 20 diciembre 2018

Se evaluó el efecto de distintos niveles de cobre (II) sobre la velocidad específica de crecimiento de *Trametes villosa* en medio PDA 4% y medio PDA 4% con 25% (v/v) de vinaza. La velocidad específica de crecimiento se obtuvo a partir de los datos de área micelial y de la ecuación para el modelo logístico de crecimiento. Las mejores condiciones para el crecimiento micelial fueron PDA 4% con 25% (v/v) de vinaza y niveles de cobre divalente de 0,5 y 1,0 mM. Estos resultados indican que, de acuerdo con las condiciones de cultivo utilizadas, ambos suplementos favorecen el crecimiento micelial y entregan información esencial para el desarrollo de potenciales procesos de reutilización y valorización de la vinaza.

Palabras clave: Hongos lignolíticos, Crecimiento *in vitro*, Biodegradación.

Abstract

Evaluation of the mycelial growth of Trametes villosa (Sw.) Kreisel in media supplemented with copper (II) and sugarcane vinasse

The effect of different levels of copper (II) on the specific growth rate of *Trametes villosa* was evaluated. The strain was grown on 4% PDA and 4% PDA on a 25% (v/v) vinasse dilution. The specific growth rate was obtained from the mycelial area data which was modeled with the logistic equation. The best growth condition was 4% PDA in a 25% (v/v) vinasse dilution with copper (II) concentrations of 0.5 and 1.0 mM. These results indicate that under the utilized culture conditions, both supplements favor mycelial growth and provide essential information for potential processes of vinasse reuse and valorization.

Key words: Lignolytic fungi, *In vitro* growth, Biodegradation.

Introducción

Los hongos lignolíticos o de pudrición blanca tienen la capacidad de biodegradar una variedad de compuestos recalcitrantes presentes en la naturaleza gracias a sus sistemas enzimáticos extracelulares (Rajaratnam *et al.* 1998, Gao *et al.* 2010, Rhodes 2014, Kaushik 2015). De esta manera, estos organismos obtienen los nutrientes necesarios para su propio desarrollo, reduciendo la biomasa o la presencia de contaminantes en distintas matrices como suelos, aguas y residuos agroforestales (Triphati *et al.* 2007).

Se conoce como micorremediación a la tecnología que utiliza los hongos y sus capacidades enzimáticas para el desarrollo de bioprocesos que reducen la contaminación o que biotransforman y valorizan los materiales residuales (Singh 2006). El desarrollo de esta tecnología empieza con la búsqueda de especies promisorias, su adaptación al cultivo en condiciones de laboratorio, la optimización del crecimiento fúngico y de las condiciones físicas y químicas bajo las cuales se da la producción de las enzimas fúngicas de interés biotecnológico (Singh 2006, Triphati *et al.* 2007, Rhodes 2014).

La medida del crecimiento fúngico o aumento de biomasa micelial es importante como variable de respuesta frente a los parámetros de fermentación e inclusive frente a situaciones de estrés (Deacon 2006, Huang *et al.* 2010). Como etapa inicial de este desarrollo tecnológico, se estudia el crecimiento fúngico a nivel de cultivo *in vitro*, en términos de indicadores macroscópicos o de crecimiento micelial e indicadores microscópicos o de crecimiento hifal. Se han aplicado varios modelos para describir la cinética de crecimiento en distintos tipos de cultivo, como el modelo lineal, exponencial, modelo logístico, como también, modificaciones de éstos (Viniestra-González *et al.* 1993, Mitchell *et al.* 2004).

La composición del medio de fermentación es un factor determinante en la producción de metabolitos o en la producción de biomasa fúngica, independientemente del tipo de fermentación que se lleve a cabo. Muchas enzimas de biotransformación se producen en cantidades pequeñas en medios primarios cuando se aplica fermentación sumergida o mixta, por lo cual se recurre a la suplementación para incrementar la producción enzimática, utilizando para ello fuentes de macro y micronutrientes y efectores como el cobre diva-

lente (Galhaup & Haltrich 2001, Strong 2011, Bertrand *et al.* 2013).

La utilización de materiales crudos o residuos como suplementos en estos medios de fermentación, se ha convertido en una alternativa para optimizar el crecimiento fúngico (López-Peña *et al.* 2013) o la producción de enzimas (Ryan *et al.* 2007). Esto es debido a la presencia de algunos inductores naturales o fuentes de carbono fácilmente disponibles que favorecen el metabolismo fúngico. El bajo costo y la disponibilidad de los materiales residuales los convierten en alternativas económicas viables para el desarrollo de biotecnologías de micorremediación (Gomes *et al.* 2009).

La biodiversidad fúngica panameña sugiere la existencia de un gran potencial de especies promisorias para el desarrollo de bioprocesos de biotratamiento y valorización de residuos (Guzmán & Piepenbring 2011). Una de las especies que se evalúan en este contexto es *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Diversos trabajos reportan el uso del género *Trametes* Fr. en micorremediación y en la bioconversión de sustratos lignocelulósicos (Paice *et al.* 1993, Ryan *et al.* 2007, Selvam *et al.* 2012).

La vinaza de caña de azúcar es un residuo agroindustrial producido en considerable cantidad en Panamá, que no cuenta con alternativas de tratamiento ni de valorización. Sin embargo, puede ser un medio complejo apropiado para el cultivo de cepas de hongos lignolíticos y la producción de enzimas (Rodríguez *et al.* 2003, Aparicio *et al.* 2013), entregando un uso alternativo potencial a este residuo.

En el presente estudio, se evaluó la cinética de crecimiento micelial *in vitro* de una cepa nativa de *T. villosa* aplicando una modificación al modelo logístico de crecimiento. Esta evaluación se realizó en función de la presencia de vinaza en el medio de cultivo, comparando la cinética de crecimiento en medios primarios sin suplementar y en medios suplementados con cobre divalente y vinaza de caña de azúcar.

Material y Métodos

Material fúngico

Se utilizó una cepa nativa obtenida de cuerpos fructíferos colectados en la comunidad de San José, Corregimiento de Las Lomas, Provincia de Chiriquí, República de Panamá (8°25'10,9"N,

82°23'28,3"W, 71 msnm). El hongo fue identificado como *T. villosa* (Polyporales) mediante caracterización morfológica y un espécimen seco fue depositado en el herbario UCH. La cepa pura de *T. villosa* se conserva en medio papa-dextrosa agar (PDA) al 4% a 25 °C con transferencias periódicas de 20 días.

Caracterización del sustrato

Se utilizó vinaza de caña de azúcar, colectada en la destilería Central Industrial Chiricana S.A. Esta se caracterizó de acuerdo con los criterios de calidad para aguas residuales del Reglamento Técnico DGNI-COPANYT 35-2000 (Ministerio de Comercio e Industrias 2000) y metodologías de análisis estándar: pH, conductividad, demanda química de oxígeno (DQO), fenoles, sólidos totales, nitrógeno amoniacal, cobre y azúcares totales (AOAC 2000, AWWA-WEF-APHA 2012). Las vinazas fueron pretratadas antes de su caracterización y utilización en los ensayos. El pretratamiento consistió en el ajuste del pH a 6 (NaOH 1 M) y posterior centrifugación a 8.500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.

Adaptación de las cepas a los medios de cultivo

Se prepararon medios suplementados con vinaza al 25 % (v/v) y medios con una concentración final de Cu (II) (CuSO₄) de 1,0 mM (Bakkiyaraj *et al.* 2013). La concentración de vinaza se seleccionó de estudios previos (Aparicio *et al.* 2013). Las cepas se cultivaron en estos medios por un mes antes de hacer las evaluaciones de crecimiento micelial.

Efecto de la presencia de Cu (II)

Para evaluar el efecto del cobre (II) sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *T. villosa*, se prepararon placas de Petri de 9 cm de diámetro, con las siguientes concentraciones finales de cobre en el medio de cultivo: 0,5, 1,0 y 2,0 mM, utilizando medio sin cobre como tratamiento control. La aplicación de cobre (II) se realizó a medios con vinaza (PDAV) y medios sin vinaza (PDA).

Se procedió a medir el área de crecimiento micelial con ayuda del software Area Met v. 2.0 (González 2006), el cual permite medir el área de cubrimiento de la placa de Petri a partir de una imagen digitalizada. Se realizaron 5 réplicas para cada tratamiento y cinco mediciones por cada réplica (en cada día de muestreo), hasta el cubri-

miento total de la placa.

La velocidad específica de crecimiento micelial (μ = días⁻¹) se calculó a partir de estos datos, aplicando el modelo logístico (ecuación 1) con modificaciones (Viniestra-González *et al.* 1993, Blanchard *et al.* 1998, Saithi *et al.* 2016):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) * X \quad (1)$$

t : tiempo; X : área de crecimiento micelial (cm²); μ : velocidad específica de crecimiento (días⁻¹); X_{max} : área máxima de crecimiento micelial (cm²).

En el modelo logístico modificado se define X_{max} como una función sigmoidea (Blanchard *et al.* 1998) de la siguiente forma:

$$X_{max} = a_0 * \left(1 - \frac{1}{1 + e^{(a_2 * (t - t_m))}} \right) \quad (2)$$

a_0 : X_{max} inicial; t : tiempo; t_m : tiempo en el cual ocurre la inflexión de la curva sigmoidea; a_2 : parámetro que controla la rapidez de cambio de X_{max} .

Se utilizó el programa Berkeley Madonna Versión 8.3.18 (Macey *et al.* 2009) para modelar y ajustar los diferentes parámetros del modelo logístico con los datos experimentales de área micelial. Este procedimiento de modelado y ajuste fue realizado para los valores de área de crecimiento (cm²) de cada una de las réplicas de cada tratamiento, obteniéndose de esta manera los valores de (μ).

Análisis estadístico

La selección del medio de cultivo (PDA o PDAV) y el nivel de cobre (II) se realizó empleando un diseño factorial (2*4) totalmente al azar con cinco réplicas. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación entre medias ($p < 0,05$) mediante un ensayo de rangos múltiples de Tukey (HSD). Estos análisis se realizaron con la ayuda del software XLSTAT (2016.02). El modelo matemático propuesto fue el siguiente:

$$\mu = \beta_0 + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} \quad (3)$$

μ_{ij} : respuesta (velocidad específica de crecimiento (días⁻¹))

β_0 : intercepto

α_i : efecto del factor nivel de cobre II ($i = 1, 2, 3, 4$)

β_j : efecto del factor medio de cultivo ($j = 1, 2$)

$(\alpha\beta)_{ij}$: efecto de interacción

Resultados y discusión

La figura 1 muestra los resultados del modelo para la réplica 1 del tratamiento PDA/vinaza 25% (v/v) sin cobre (CuII-0*-PDAV). En este trabajo,

la modificación introducida en el modelo logístico produjo excelentes resultados en el ajuste y modelado de los datos, lo cual se refleja en los valores de R^2 (Tabla 1). La parametrización de X_{max} mediante la función (2), describe el comportamiento esperado de X_{max} , el cual puede disminuir significativamente debido a variaciones en diversos factores como el pH o la producción de sustancias nocivas o inhibitorias del crecimiento.

Los resultados del ANOVA muestran que tanto los factores individuales, nivel de cobre y medio

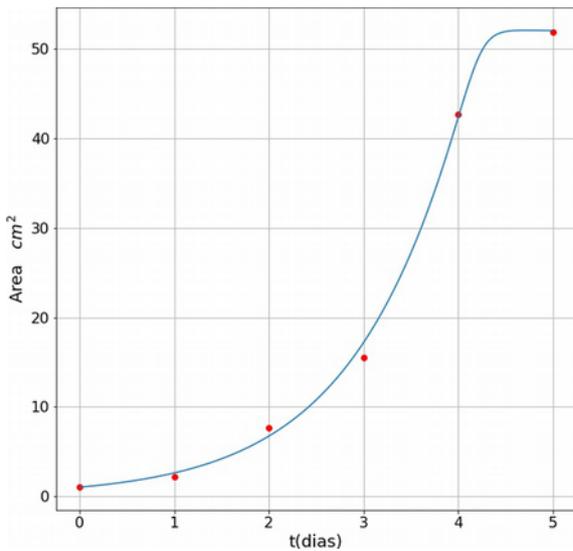


Figura 1. Modelado del crecimiento micelial para la réplica 1 del tratamiento PDA/vinaza 25% (v/v) sin cobre (CuII-0*PDAV). $\mu=0,967$; $a_0=463,461$; $a_1=10,940$; $t_m=4,002$; $a_2=515,359$; $R^2=0,981$.

Figure 1. Mycelial growth model for PDA/vinasse 25% (v/v) without copper (CuII-0*PDAV), replicate 1. $\mu=0.967$; $a_0=463.461$; $a_1=10.940$; $t_m=4.002$; $a_2=515.359$; $R^2=0.981$.

Tratamientos	μ (días ⁻¹)	R^2
Cu II-0*-PDA	0,737 ± 0,014 ^a	0,999
Cu II-0,5*-PDA	0,760 ± 0,014 ^a	0,999
Cu II-2*-PDA	0,785 ± 0,014 ^{ab}	0,999
Cu-II-1*-PDA	0,829 ± 0,014 ^b	0,999
Cu II-2*-PDAV	0,839 ± 0,014 ^b	0,999
Cu II-0,5*-PDAV	0,918 ± 0,014 ^c	0,999
Cu II-0*-PDAV	0,940 ± 0,014 ^c	0,999
Cu II-1*-PDAV	0,954 ± 0,014 ^c	0,999

Tabla 1. Medias (LS) y error estándar de la velocidad específica de crecimiento (μ) para los tratamientos combinados: nivel de cobre II y medio de cultivo (PDA o PDAV), obtenidas mediante el ajuste de los datos experimentales con el modelo logístico modificado. Se muestran los coeficientes de determinación (R^2) correspondientes. Medias con igual superíndice no difieren significativamente ($\alpha < 0,05$).

Table 1. Specific growth rate means (LS) for the combined treatments: copper II level and culture medium (PDA or PDAV). Means were obtained after the adjustment of the experimental data with the modified logistic equation. The corresponding determination coefficients (R^2) are shown. Means with the same superscript have no significant differences ($\alpha = 0.05$).

de cultivo, como el efecto combinado de los mismos fueron significativos ($p < 0,05$) sobre (μ). La significancia en la interacción hace que este efecto tome la relevancia principal y los factores individuales una relevancia secundaria sobre esta variable de respuesta. Los datos se ajustaron al modelo lineal propuesto (ecuación 3), el cual fue significativo ($p < 0,05$), con un R^2 ajustado de 0,854. La figura 2 muestra la relación entre los valores de predicción para (μ) y los valores obtenidos mediante el modelo de crecimiento (Tabla 1).

La comparación de medias de la velocidad específica de crecimiento de los tratamientos combinados, nivel de cobre y medio de cultivo para un 95% de confianza (Tabla 1), muestra que las mejores condiciones son el medio de cultivo con vinaza 25% (v/v) sin cobre (CuII-0*-PDAV) y el medio con vinaza 25% (v/v) con concentraciones de cobre (II) de 0,5 y 1,0 mM (CuII-0,5*-PDAV y CuII-1,0*-PDAV) ($p > 0,05$). Las diferencias cualitativas en el crecimiento micelial para distintos tratamientos al cuarto día de observación se muestran en la figura 3.

La adaptación de cepas de hongos lignolíticos a diversos medios de cultivo y a la presencia de contaminantes, es una de las primeras etapas en la prospección de especies promisorias que puedan ser utilizadas en el desarrollo de tecnologías de biorremediación y en la valorización de residuos (Elgueta *et al.* 2012, Lee *et al.* 2014). Esta información es fundamental para el inicio del desarrollo de protocolos a nivel de laboratorio en los

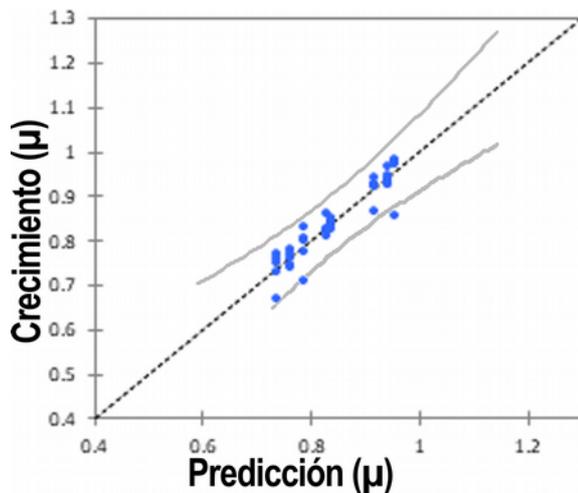


Figura 2. Relación entre los valores de predicción para la velocidad específica de crecimiento (μ) y los valores obtenidos mediante el modelo.

Figure 2. Relationship between the prediction values for the specific growth rate (μ) and the values obtained through the model.

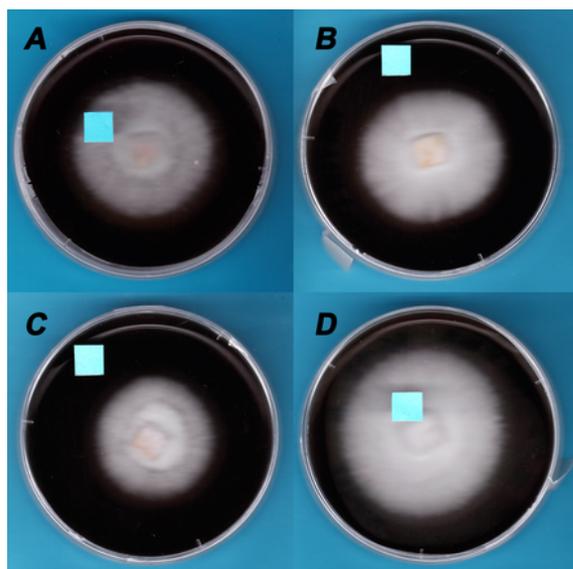


Figura 3. *T. villosa* en PDA 4%/ vinaza 25% (v/v), día 4. **A:** 0,5 mM de Cu II (Cu II-0,5*-PDAV); **B:** 1,0 mM de Cu II (Cu II-1*-PDAV); **C:** 2,0 mM de Cu II (Cu II-2*-PDAV); **D:** sin cobre (Cu II-0*-PDAV).

Figure 3. *T. villosa* in PDA 4%/ vinasse 25% (v/v) day 4. **A:** 0.5 mM Cu II (Cu II-0.5*-PDAV); **B:** 1.0 mM Cu II (Cu II-1*-PDAV); **C:** 2.0 mM Cu II (Cu II-2*-PDAV); **D:** without copper (Cu II-0*-PDAV).

que se aprovechen las capacidades bioquímicas de estos organismos.

El crecimiento micelial medido como área o diámetro en función del tiempo, es una de las variables de respuesta macroscópica utilizada en estudios de adaptación *in vitro* (Lee *et al.* 2014, Gutiérrez-Soto *et al.* 2015, Martínez *et al.* 2015). A partir de esta variable primaria, se obtienen características de crecimiento secundarias como es el caso de la velocidad específica de crecimiento (μ) (Panikov 2011), el cual es un parámetro combinado que abarca las distintas etapas de la morfogénesis micelial (Viniestra-González *et al.* 1993).

El crecimiento fúngico, depende de factores tanto físicos como químicos, siendo uno de ellos la composición del medio de cultivo (Deacon 2006, Jo *et al.* 2010, Chauhan 2016). En el presente estudio se utilizaron la vinaza y el cobre II como suplementos al medio de cultivo primario para evaluar su efecto sobre (μ). Se observó que la cepa de *T. villosa* tiene un mejor crecimiento micelial en medio con vinaza que en medio sin vinaza. La tabla 2 muestra el resultado del análisis fisicoquímico de la vinaza. La presencia de azúcares, de nitrógeno y de la materia orgánica que es fuente de carbono, influye positivamente en el crecimiento del hongo (Rodrigues & Hu, 2017).

Parámetro	Vinaza Pretratada	Unidades
pH (25° C)	5,88 ± 0,09	unidades de pH
conductividad	5.670 ± 86	μS/cm
Sólidos totales	35.556 ± 492	mg/L
DQO	21.485 ± 68	mg/L
fenoles	1,94 ± 0,43	mg/L
Nitrógeno amoniacal	2,0 ± 0,08	mg/L
Cobre	1,54 ± 0,06	mg/L
Azúcares totales	23 ± 0,10	mg/mL

Tabla 2. Caracterización química de la muestra de vinaza pretratada.

Table 2. Chemical characterization of pretreated vinasse.

Tomando como referencia la dilución utilizada, este resultado es el esperado desde la perspectiva del desarrollo de tecnologías de reutilización y valorización de este efluente. La vinaza es un material producido en grandes cantidades lo cual implica disponibilidad y esto a su vez se relaciona con los costos de la valorización. Muchos esfuerzos se dedican a la optimización de los costos de los procesos de obtención de enzimas de interés; en este caso, la vinaza puede ser un medio de amplificación para la producción de enzimas lignolíticas a partir de la cepa evaluada. (Quintero *et al.* 2006, Zanirun *et al.* 2009, Aguiar *et al.* 2010).

Rodríguez *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares con *Pleurotus* spp. en los que también se observó un mejor crecimiento de la cepa en medios con vinaza en comparación con el medio primario control. Rodríguez *et al.* (2003) y Aparicio *et al.* (2013) reportan que este efecto estimulante del crecimiento fúngico observado en presencia de vinaza, no se mantiene en concentraciones (v/v) mayores al 50%, lo cual se puede anticipar por el aumento en la concentración de sustancias que provocan un efecto inhibitorio (Rodríguez *et al.* 2006). Ferreira *et al.* (2010) obtuvieron resultados distintos a lo reportado por Rodríguez *et al.* (2003) respecto a las concentraciones v/v óptimas de vinaza en el medio de cultivo para hongos del género *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. Alvillo-Rivera (2016), reporta un mejor crecimiento *in vitro* en presencia de vinazas tequileras para *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Quél. en comparación con *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P.Kumm. y *Phanerochaete chrysosporium* Burds.. Además de la especie de hongo de pudrición blanca utilizada y del diseño metodológico aplicado, los resultados observados en distintos estudios dependen de la composición de la

vinaza, lo cual a su vez es función de factores como la materia prima y el proceso de destilación (Ahmed *et al.* 2013).

El efecto de la presencia de cobre sobre la producción de biomasa micelial y de enzimas lignolíticas como las lacasas (1,2-benzenediol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) ha sido evaluado en medio sumergido por distintos investigadores (Preussler *et al.* 2009, González *et al.* 2013). Esta enzima está asociada a los procesos de invasión de sustratos lignocelulósicos, detoxificación y degradación de lignina y de compuestos fenólicos (Galhaup & Haltrich 2001, Bertrand *et al.* 2013). El cobre divalente es un micronutriente esencial para muchos organismos y además es un cofactor de lacasa (Griffith *et al.* 2007, Viswanath *et al.* 2014). El efecto de la deficiencia de cobre sobre la morfología y crecimiento de varias cepas cultivadas *in vitro* en medios sintéticos convencionales ha sido reportado por Griffith *et al.* (2007).

La suplementación del medio (PDAV) con niveles de cobre (II) de 0,5 y 1,0 mM, produjo mayor crecimiento micelial que la suplementación con 2,0 mM y que los medios suplementados con los mismos niveles de cobre (II) en ausencia de vinaza (PDA). Sin embargo, no hubo diferencia en el crecimiento micelial para el medio (PDAV) sin cobre II y los medios (PDAV) suplementados con 0,5 y 1,0 mM de cobre ($p > 0,05$). La vinaza contiene cobre (Tabla 2) por lo que es posible que la adición de 2,0 mM de cobre II a la vinaza exceda la concentración de este micronutriente que es requerida por la cepa. No se encontró en la literatura revisada información sobre el efecto del cobre (II) en medios con vinaza en cultivos *in vitro*, por lo cual se requiere de posteriores estudios para profundizar sobre este tema. Los resultados obtenidos para el medio sin vinaza (PDA), concuerdan con lo reportado en la literatura respecto a las concentraciones óptimas de cobre divalente en experimentos de producción micelial y enzimática (Bakkiyaraj *et al.* 2013) con basidiomicetos a nivel de laboratorio.

El diseño metodológico utilizado en este estudio podría ser evaluado con otras cepas y otros efluentes o suplementos en el medio de cultivo. Los resultados presentados proporcionan información importante sobre la adaptación de *T. villosa* a la presencia de cobre (II) y de vinazas de caña de azúcar; ellos son parte de un proyecto de biotratamiento y valorización de vinazas, mediante el aprovechamiento sostenible de la bio-

diversidad fúngica panameña.

Agradecimientos

El presente estudio recibió apoyo económico de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) a través del Sistema Nacional de Investigación (SNI). Agradecemos el apoyo de las Licenciadas Delitza Samudio, Dayra Icaza y del Dr. Esmat Camargo de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas (UNACHI); a la Dra. Dalys Rovira del Laboratorio de Análisis de Aguas y Servicios Físicoquímicos (UNACHI) agradecemos la colaboración con parte de los análisis de la vinaza. De igual forma, a la Central Industrial Chiricana S.A. por facilitarnos las muestras de vinaza y a las estudiantes Leila González e Iris Fossati por su colaboración con el material fúngico.

Referencias

- Aguiar MM, Ferreira LF & Monteiro R. 2010. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (5): 1245-1254. doi: 10.3923/pjbs.2010.355.361
- Ahmed O, Sulieman AME & Elhardallou SB. 2013. Physicochemical, chemical and microbiological characteristics of vinasse, a by-product from ethanol Industry. *American Journal of Biochemistry* 3(3): 80-83. doi: 10.5923/j.ajb.20130303.03
- Alvillo-Rivera Angélica. 2016. Tratamiento de vinazas de tequila con hongos basidiomicetos. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría.
- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*. Washington D.C: Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- AWWA-APHA-WEF. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd edition. Rice E, Baird R, Eaton A, Clescer L. (eds). Washington D.C: AWWA-APHA-WEF.
- Aparicio M, De Gracia D, Navarro G, Vega K, González L, Hoffman T, González P, Jiménez V, Caballero RE & Miranda M. 2013. Evaluación de la capacidad de crecimiento de cepas nativas de *Flaviporus* sp. y *Trametes villosa* en medios complejos preparados con vinazas de destilería. En *Memorias del III Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA)*, Panamá: Imprenta Universitaria de la Universidad Autónoma de Chiriquí. p. 134
- Bakkiyaraj S, Aravindan R, Arrivukkarasan S & Viruthagiri T. 2013. Enhanced laccase production by *Trametes hirsuta* using wheat bran under submerged fermentation. *International Journal on Chem Tech Research* 5: (3) 1224-1238. Disponible en <http://www.>

- sphinxesai.com/2013/vol_5_3/pdf/CT=18(1224-1238) IPACT.pdf (accedido el 3-IV-2017).
- Bertrand B, Martínez-Morales F & Trejo-Hernández MR. 2013. Fungal laccases: Induction and production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(3): 473-488. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966010> (accedido el 27-VII-2016).
- Blanchard P, Devaney R & Hall, G. 1998. Ecuaciones Diferenciales. Washington: International Thomson Editors.
- Chauhan R. 2016. Optimization of physical parameters for the growth of a white rot fungus-Trametes versicolor. *International Journal of Information Research and Review*. 03, Issue, 11, pp. 3125-3128. Disponible en: <http://www.ijirr.com/sites/default/files/issues-files/1390.pdf> (accedido el 15-VI-2017).
- Deacon J. 2006. *Fungal Biology*. Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd.
- Elgueta S, Rubilar, O, Lima N & Diez C. 2012. Selection of white-rot fungi to formulate complex and coated pellets for Reactive Orange 165 decolorization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(6): [13]. doi: 10.2225/vol15-issue6-fulltext-10
- Ferreira LF, Aguiar M, Pompeu G, Messias TG & Monteiro RR. 2010. Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1613–1621. doi: 10.1007/s11274-010-0337-3
- 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. doi:10.1007/s002530100636
- Gao D, Du L, Yang J, Wu WM & Liang H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(1): 70–77. doi:10.3109/07388550903427272
- Gomes E, Aguiar AP, Carvalho CC, Bonfá MRB, Da Silva R & Boscolo M. 2009. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application on the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:31-39. doi:10.1590/S1517-83822009000100005
- González P. 2006. *Area Met v. 2.0*. Chiriquí, Panamá: Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Chiriquí.
- González JC, Medina SC, Rodríguez A, Osma JF, Alméciga-Díaz CJ & Sánchez OF. 2013. Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. *Plos One* 8 (9): 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.007.3721
- Griffith G, Easton G, Dethridge A, Roderick K, Edwards A, Worgan H, Nicholson J & Perkins W. 2007. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters* 276: 165-171. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00923.x
- Gutiérrez-Soto G, Medina-González G, Treviño-Ramírez J & Hernández-Luna C. 2015. Native macrofungi that produce lignin-modifying enzymes, cellulases, and xylanases with potential biotechnological applications. *Bioresources* 10 (4), 6676–6689. doi: 10.15376/biores.10.4.6676-6689.
- Guzmán G & Piepenbring M. 2011. Los hongos de Panamá: introducción a la identificación de los macroscópicos. Xalapa, Veracruz: Instituto de Ecología, A.C.
- Huang DL, Zeng GM, Feng CL, Hu S, Zhao MH, Lai C, Zhang Y, Jiang XY & Liu HL. 2010. Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress. *Chemosphere* 81(9): 1091-1097. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.029
- Jo WS, Kang MJ, Choi SY, Yoo YB, Seok SJ & Jung HY. 2010. Culture conditions for mycelial growth of *Coriolus versicolor*. *Mycobiology* 38(3): 195-202. doi:10.4489/MYCO.2010.38.3.195
- Kaushik G. 2015. Bioremediation of industrial Effluents: Distillery effluent. En *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends* (Kaushik G, ed.). New Delhi: Springer, pp.19-32
- Lee H, Jang Y, Choi YS, Kim MJ, Lee J et al. 2014. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAH's. *Journal of Microbiological Methods* 97, 56-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.007>
- López-Peña D, Gutiérrez A & Esqueda M. 2013. Cinética de crecimiento y composición química del micelio de *Lentinula edodes* cultivado en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid. *Revista Mexicana de Micología* 37:51-59. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88331056007> (accedido el 20-X-2016).
- Macey R, Oster G & Zahley T. 2009. Berkeley Madonna. v. 8.3.18. Berkeley: University of California.
- Martínez DA, Buglione MB, Filippi MV, Reynoso L, Rodríguez GE, & Agüero MS. 2015. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. *Anales de Biología* 37: 1-10. doi: 10.6018/analesbio.37.1
- Ministerio de Comercio e Industrias, 2000. Descarga de efluentes líquidos directamente a cuerpos y masas de agua superficiales y subterráneas. Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 35-2000, Panamá, República de Panamá. Disponible en: <http://miambiente.ob.pa/images/file/COPANIT-35-2000DESCARGA%20DE%20EFLUENTES%20LIQUIDOS%20DIRECTAMENTE%20A%20CUERPOS%20Y%20MASAS%20DE%20AGUA%20SUPERFICIALES%20Y%20SUBTERRANEAS.pdf> (accedido el 11-V-2016)
- Mitchell DA., Von Meien OF, Krieger N & Dalsenter FD. 2004. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 17 (1) 15-26. doi:10.1016/S1369-703X (03)00120-7
- Paice, MG, Reid ID, Bourbonnais R, Archibald FS & Jurasek L. 1993. Manganese peroxidase produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology* 59:260-265. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202088/> (accedido el 2-III-2018).

- Panikov NS. 2011. Microbial growth dynamics. En *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young M, ed.). Oxford: Elsevier. pp.257–283. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00032-5
- Preussler C, Shimizu E, Villalba L & Zapata P. 2009. Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (s.w.: Fr) Kreisel. *Revista Ciencia y Tecnología*. Año 11, No 12. 9-16. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872009000200002&lng=es&tng=es (accedido el 9-VII-2017).
- Quintero JC, Feijoo G & Lema JR. 2006. Producción de enzimas lignolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Colombia* 13 (2): 61-67. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169813258008> (accedido el 24-I-2018).
- Rajaratnam S, Somasundaram M, Bano Z. 1998. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. *Critical Reviews in Biotechnology* 18 (2&3) 91-236.
- Rhodes CJ. 2014. Mycoremediation (bioremediation with fungi) –growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation & Bioavailability* 26(3): 196-198. doi: 10.3184/095422914X14047407349335.
- Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez R & Morris S. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 164-168. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2003-20/index.shtml> (accedido el 16-XI-2017).
- Rodríguez S, Bermúdez R, Serrat M & Kourouma A. 2006. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología* 23: 9-15. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88302303> (accedido el 13-IV-2017).
- Rodríguez C & Hu B. 2017. Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization? *Frontiers in Energy Research* 5 [7]. doi: 10.3389/fenrg.2017.00007.
- Ryan D, Leukes W & Burton S. 2007. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters with *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 98 (3): 579-587. doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.001
- Saithi S, Borg J, Nopharatana M & Tongta A. 2016. Mathematical modeling of biomass and enzyme production kinetics by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation at various temperatures and moisture contents. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 8: 123-130. doi: 10.4172/19485948.1000274.
- Selvam K, Priya M, Yamuna M. 2012. Decolourization of azo dyes and dye industry effluents by lignin degrading fungus *Trametes versicolor*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 3(3) 666-672. Disponible en: <http://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/696> (accedido el 6-XII-2017).
- Singh, Harbhajan. 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. New Jersey: John Wiley and Sons.
- Strong PJ. 2011. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Hindawi Volume* 2011: [8]. doi: 10.4061/2011/379176.
- Tripathi A, Harsch N & Gupta N. 2007. Fungal Treatment of Industrial Effluents: A Mini Review. *Life Sciences Journal* 4 (7) 78-81. Disponible en: http://www.lifesciencesite.com/lj/life0402/17_life0402_78_81.pdf (accedido el 4-II-2018).
- Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G, López-Ilsunza F & Favela-Torres E. 1993. Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1-10. doi: 10.1002/bit.260420102
- Viswanath B, Rajesh B, Janardham A, Praven A, & Narasimha T. 2014. Fungal laccases and their application in bioremediation. *Hindawi Publishing Corporation, volume* 2014: [21]. doi:10.1155/2014/163242
- Zanirun Z, Abd-Aziz S, Ling FH & Hassan MA. 2009. Optimization of lignin peroxidase production using locally isolated *Pycnoporus* sp. through factorial design. *Biotechnology* 8(3):296-305. doi: 10.3923/biotech.2009.296.305