

## **Evaluación de la actividad ligninolítica de cuatro cepas fúngicas desarrolladas en olote y madera**

Marquez-Badillo Adalberto, Ávila-Jiménez Miguel\*, Espinoza-Castañeda Marisol,  
Cruz-Colín María del Rocío, Castañeda Briones María Teresa, Chávez-Martínez Margarita.

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México. C.P. 02200. México.

\*Autor para correspondencia: miaj@correo.azc.uam.mx

### **Recibido:**

11/mayo/2018

### **Aceptado:**

28/julio/2018

### **Palabras clave:**

Lacasa, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa.

### **Keywords:**

ligninolytic activity, laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase.

### **RESUMEN**

En este trabajo se evaluó la actividad ligninolítica de cuatro cepas fúngicas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos. Se comparó su crecimiento usando dos soportes: madera y olote de maíz, para lo cual primero se determinó de forma cualitativa la actividad de las enzimas Lacasa (Lac), Manganeso Peroxidasa (MnP) y Lignina Peroxidasa (LiP). Después, cada cepa fue inoculada en reactores individuales utilizando alguno de los soportes e incubadas durante 4 semanas a temperatura ambiente. Durante el proceso de incubación, cada semana se determinó la actividad de las enzimas antes mencionadas. Con base en los resultados, el mejor desarrollo de las cuatro cepas se presentó en el olote de maíz. La cepa HBG presentó actividad de las enzimas Lac y MnP, mientras que la cepa M1H5 mostró actividad de LiP. Estas cepas presentaron los mejores resultados de actividad ligninolítica, por lo cual es factible que sean utilizadas en un proceso de biorremediación.

### **ABSTRACT**

In this work, the ligninolytic activity of four fungal strains isolated from a hydrocarbon contaminated soil was evaluated. Their growth was compared using two supports: wood and olote, for which the enzymatic activity of laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) were first determined qualitatively. Afterwards, each strain was inoculated in individual reactors using either support for 4 weeks at room temperature. During the incubation process, every week the activity of the previously mentioned enzymes was determined. Based on the results, the best development out of the four strains was presented in the olote. The HBG strain had a positive response for Lac and MnP enzymes, the M1H5 strain showed a positive response for the LiP enzyme. These strains presented the best results of ligninolytic activity, which is why they are feasible to be used in a bioremediation process.

## Introducción

La contaminación del suelo se define como el incremento o introducción de sustancias que pueden ejercer un efecto dañino sobre los organismos; algunas de estas sustancias pueden ser degradadas por los organismos autóctonos y otras son persistentes. El daño que puede ocasionar a los animales y plantas puede ser de bajo o de alto impacto, lo cual dependerá de sus propiedades físico-químicas, concentración y de la dispersión del contaminante en este medio (Bautista, 1999).

De las tecnologías existentes para remediar los suelos, la biorremediación ha obtenido una amplia aprobación para el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), ya que se considera segura, respetuosa con el ambiente y económica. En particular, las técnicas de biorremediación para suelos contaminados con HAP incluyen opciones de tratamiento *in situ* como biolabranza, la bioestimulación, bioaumentación, compostaje y fitorremediación, además de tratamientos *ex situ* como los biorreactores (Gan et al., 2009).

Por otra parte, la biorremediación enzimática ha demostrado ser extremadamente eficiente y selectiva en comparación con los catalizadores químicos debido a un número menor de condiciones de reacción, mayores velocidades de reacción, mayor estereoespecificidad y la capacidad de catalizar reacciones a temperaturas relativamente bajas en un amplio rango de pH (Kuppusamy et al., 2017).

Los hongos de pudrición blanca, son capaces de degradar hasta cierto punto la ligninocelulosa utilizando diferentes mecanismos que los distinguen por la forma en que hace que las celulosas y hemicelulosas sean accesibles para la degradación por las enzimas involucradas y su comportamiento en la degradación de madera. Estos mecanismos se clasifican generalmente como podredumbre blanca, pudrición parda y pudrición blanda. La pudrición blanca es el único mecanismo de estos tres que puede degradar completamente la estructura de la madera y despolimerizar la lignina. La pudrición blanca se asocia típicamente con la desintegración de la madera dura y el material resultante tiene un aspecto uniformemente blanco o muestra áreas de decaimiento o bolsas de pudrición blanca (Kubicek, 2012).

Las principales enzimas oxidativas secretadas por los hongos de pudrición blanca y responsables de la oxidación de la lignina y de compuestos análogos a la lignina son la Lignina Peroxidasa (LiP), la Manganese Peroxidasa

(MnP) y la Lacasa (Lac) (Wan y Li, 2012), sin embargo, algunas otras enzimas como la celobiosa quinona oxidorreductasa (CBQ), celobiosa deshidrogenasa (CDH), glioxalato oxidasa (GlOx), alcohol oxidasa de veratrilo (AOV) y algunas esterasas también pueden desempeñar un papel en el complejo proceso de decaimiento de la madera (Call y Mücke, 1997).

Por lo general los hongos que secretan este tipo de enzimas son los basidiomicetos, los cuales poseen un sistema enzimático oxidativo extracelular que es utilizado para las primeras etapas en el ataque a la lignina poliaromática, realizando reacciones extracelulares que incluyen la despolimerización de la lignina, así como la desmetoxilación, descarboxilación, hidroxilación y la apertura de los anillos aromáticos. Mientras que los anillos de los HAP son bencenos fusionados, la lignina es un polímero mucho más grande, más heterogéneo y amorfo formado de propilbenceno con un alto contenido de enlaces éter y cadenas laterales de carbono. Por lo tanto, la capacidad de los microorganismos para degradar los HAP es diferente en comparación con la degradación de la lignina, sin embargo, tanto la lignina como los HAP son hidrófobos e insolubles y plantean problemas similares para la catálisis por enzimas que tienden a ser solubles en agua, los hongos de la pudrición blanca degradan la lignina con agentes oxidantes generados por sus enzimas extracelulares y lo mismo sucede en la degradación de los HAP (Harvey y Christopher, 2001).

Se han realizado diversas investigaciones analizando cepas de diversos tipos de hongos. Acevedo y colaboradores (2011) evaluaron la degradación de los HAP con el hongo de pudrición blanca *Anthracyllum discolor*, aislado del bosque del sur de Chile. Se evaluó la eficacia en la eliminación de los HAP en suelo con presencia y ausencia de microorganismos autóctonos. También, determinaron la producción de enzimas degradadoras de lignina, teniendo como conclusiones que el hongo *A. discolor* fue capaz de degradar los HAP, además se observó una alta capacidad en la remoción de fenantreno (62%), antraceno (73%), fluoranteno (54%), pireno (60%) y benzo- $\alpha$ -pireno (75%). Esta degradación estuvo asociada con la producción de la enzima MnP, (Acevedo et al., 2011).

Otra investigación fue la que hicieron Kuppusamy y colaboradores (2017), donde probaron la enzima Lac de un hongo *Trametes sp.*, para evaluar su potencial de oxidación en 15 suelos de campo contaminados con HAP en presencia de sulfonato de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina como mediador; se documentaron los resultados de la transformación enzimática de los

HAP en intermedios menos tóxicos como el antraceno y antraquinona. Cuando se modificó la concentración de la enzima a 10 U/g la degradación de los HAP fue mayor. En el primer día con 10 U/g de Lac casi 24% de HAP se degradaron. Sin embargo, una de las limitaciones en la aplicación más amplia de la biorremediación enzimática son las financieras (Kuppusamy et al., 2017).

Es importante mencionar el trabajo de García y colaboradores, donde analizaron la producción de lacasa por el hongo comestible-medicinal del género *Pleurotus*. En el trabajo presentaron los resultados de la producción de la Lac en inóculos preparados con sorgo, maíz y pulpa de café con las siguientes dos cepas: *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021 y *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024. El periodo de incubación fue de 15 a 21 días midiendo la actividad cada 7 días. La extracción de la enzima fue en medio acuoso y utilizando como sustrato guayaquil para la determinación de la actividad enzimática de la Lac. Con la cepa CCEBI 3024 alcanzaron los mayores valores de actividad enzimática con la pulpa de café en 21 días con  $12.28 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ , le siguió el sorgo con  $8.73 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ , el menor valor fue con el maíz con  $4.95 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ . Con la cepa CCEBI 3021, los valores mayores de actividad se alcanzaron con sorgo obteniendo  $21.77 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ , le siguió la pulpa de café con  $14.35 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ , y el valor menor con maíz de  $5.01 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ . Se esperaba este comportamiento ya que la composición del sorgo y el maíz, a pesar de ser semejantes, en el sorgo hay presencia de polifenoles al igual que la pulpa de café (García et al., 2017).

La remediación de los suelos es un tema muy importante, debido a que la contaminación disminuye la capacidad del mismo para producir bienes y servicios, y es porque la regeneración natural del suelo suele ser muy lenta. Como ya se ha mencionado cuando un suelo está contaminado puede ocasionar efectos nocivos en el hombre, fauna y flora. Es por esto que es necesario controlar la contaminación del suelo para preservar la fertilidad y la productividad del mismo (Jiménez, 2017)

El objetivo de este trabajo fue comparar el crecimiento de cuatro cepas desarrolladas en dos soportes: madera y olote, y determinar la actividad ligninolítica con la finalidad de elegir un soporte y las dos cepas con mayor actividad para ser aplicadas posteriormente en un proceso de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos.

## Metodología

### Determinación cualitativa de la actividad ligninolítica de Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa

Las cepas utilizadas en este proyecto HBC9, HBC7, HBG y M1H5 pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Azcapotzalco. Estas cepas fueron aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos, provenientes de Coatzacoalcos Veracruz México (Cruz et al., 2011).

Las cepas fueron sembradas en placas de medio sólido con la siguiente composición por litro: 10 g de glucosa, 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ . Para la determinación de la actividad de la Lac se agregaron al agar 250 mg/L de 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS). Para la determinación de la actividad de la MnP, se agregó al medio sólido 0.1 g/L de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . (Steffen et al., 2000).

Finalmente, para la determinación de la actividad de la LiP se utilizaron placas de agar noble adicionadas con 10 ppm de azul de metileno.

### Evaluación del desarrollo fúngico en los soportes lignocelulósicos

Se preparó una suspensión de esporas maduras de cada cepa a partir de un cultivo desarrollado en agar extracto de malta e incubado durante cuatro semanas a temperatura ambiente. Se tomaron 20 mL de esta suspensión y se sembró en biorreactores con 10 g en base seca de olote o madera previamente esterilizados en autoclave. Los soportes suministraron a los hongos una fuente de carbono adecuada para su crecimiento.

### Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica de Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa

A partir de cultivos desarrollados en los soportes se prepararon extractos enzimáticos utilizando 50 mL de solución salina estéril al 0.8%; los extractos se almacenaron en tubos de ensayo. Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos para separar la biomasa. Las determinaciones de la actividad ligninolítica de las tres enzimas se realizaron con el sobrenadante a temperatura ambiente (Juárez, 2014). Se midió la actividad ligninolítica semanalmente

durante 4 semanas, utilizando un espectrofotómetro modelo EPOCH2, marca Biotek. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

La actividad de la enzima LiP se determinó por el método basado en la oxidación del alcohol veratrílico por  $H_2O_2$ , midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 310 nm (Tien y Kirk, 1988). La reacción se realizó con 150  $\mu$ L del extracto enzimático, agregando 130  $\mu$ L de alcohol veratrílico 2 mM, posteriormente para iniciar la reacción, se agregaron 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.2 mM a un pH de 3.0.

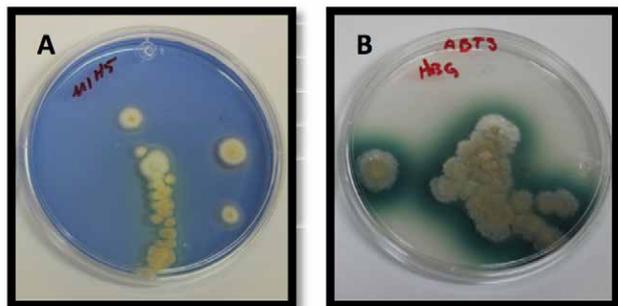
La actividad de la MnP se determinó por el método basado en la oxidación del 2,6-dimetoxifenol (DMP) a 3,3',5,5'-te trametoxidifenolquinona, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 469 nm (Kapich et al., 2003). El sistema de reacción se preparó con 150  $\mu$ L del extracto enzimático, 130  $\mu$ L de DMP 0.5 mM con sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ) 1 mM, iniciándose la reacción agregando 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.1 mM a un pH de 4.5.

La actividad de la Lac se determinó por el método colorimétrico, utilizando el reactivo ABTS y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 436 nm (Wolfenden y Wilson, 1982). La reacción se llevó a cabo mezclando 150  $\mu$ L del extracto enzimático con 150  $\mu$ L del reactivo ABTS 1 mM.

## Resultados y discusión

### Determinación cualitativa de la actividad ligninolítica de Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa

En las pruebas cualitativas en cajas Petri, la cepa HBG tuvo una respuesta positiva para las enzimas MnP y Lac, en cuanto a la LiP los resultados fueron negativos. Las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 no presentaron resultados positivos para la actividad de Lac y MnP, pero si un resultado positivo para LiP (figura 1 y tabla 1).



**Figura 1.** A. Prueba positiva de la actividad de LiP (presencia de un halo transparente) en la cepa M1H5. B. Prueba positiva de la actividad de Lac (presencia de halo verde) en la cepa HBG.

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas cualitativas de actividad ligninolítica en las tres cepas de hongos.

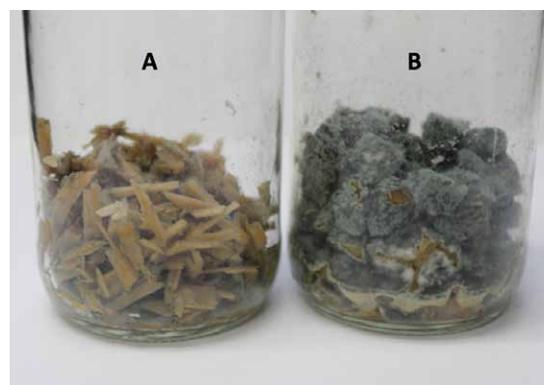
CEPA	Lac	MnP	LiP
HBC7	-	-	+
HBC9	-	-	+
HBG	+	+	-
M1H5	-	-	+

(+) Prueba positiva, (-) prueba negativa.

### Evaluación del desarrollo fúngico en los soportes lignocelulósicos

Se observó que las cuatro cepas se desarrollaron mejor en la primera semana de inoculación teniendo al olote como soporte. Como se puede observar en la figura 2.

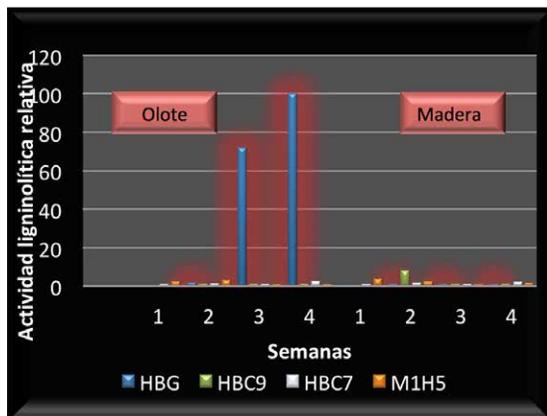
En la figura 2A, se puede observar el desarrollo de la cepa HBG usando como soporte la madera y en la figura 2B, se ve el desarrollo de la misma cepa HBG, pero en el olote como soporte. Aunque las cepas también se desarrollaron en la madera, este desarrollo fue mucho menor que el que se presentó en el olote.



**Figura 2.** Reactores con la cepa HBG desarrollada durante una semana en: A. madera y B. olote.

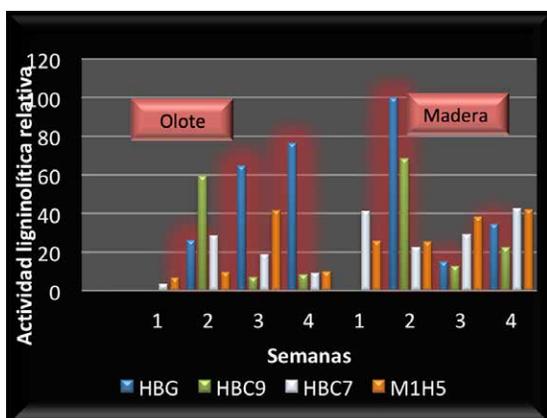
### Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica de Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa

La cepa HBG fue la única que presentó actividad enzimática de Lac, en particular en el soporte de olote, confirmando la prueba cualitativa. Las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 no mostraron actividad ligninolítica para la enzima Lac en ninguno de los soportes. La actividad ligninolítica se reporta como actividad relativa entre las cuatro cepas fúngicas, es decir se comparan con la cepa que tuvo mayor actividad para cada enzima, como se muestra en las figuras 3, 4 y 5.



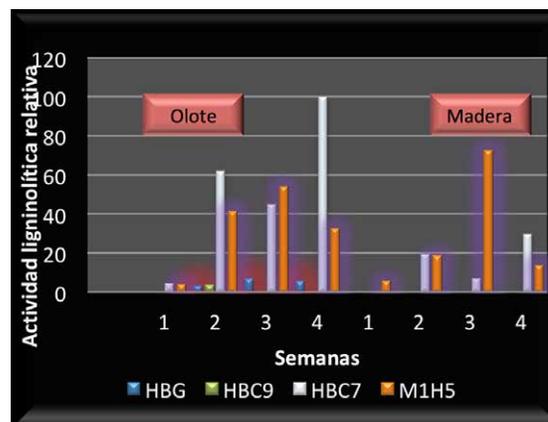
**Figura 3.** Actividad relativa de Lac. La cepa HBG muestra la mejor actividad ligninolítica, teniendo al olote como soporte.

En la prueba para MnP la cepa HBG desarrollada en madera como soporte, presentó la mejor actividad de esta enzima en la segunda semana de incubación, sin embargo, no fue así en la tercera y cuarta semana. En comparación con la misma cepa crecida en olote como soporte, se observó un aumento progresivo de la actividad ligninolítica durante las 4 semanas de incubación. La cepa HBC9, tuvo actividad ligninolítica para esta enzima con ambos soportes en la segunda semana de haber sido incubados. Sin embargo, en la tercera y cuarta semana la actividad ligninolítica disminuyó significativamente. Con la cepa M1H5 sólo se observó actividad ligninolítica con el olote como soporte en la tercera semana de inoculación, con la madera se observó actividad ligninolítica progresiva a partir de la segunda a la cuarta semana de haber sido inoculada. Sin embargo, esta actividad no es comparable con la actividad de la cepa HBG. Por último, la cepa HBC7 tuvo actividad ligninolítica con el olote en la segunda semana de desarrollo y disminuyó en la tercera y cuarta de semana. Con la madera se observó el incremento de la actividad ligninolítica de la segunda a la cuarta semana de crecimiento. Actividad que no es comparable con la cepa HBG, ver figura 4.



**Figura 4.** Actividad ligninolítica de MnP. La cepa HBG con el olote como soporte muestra un aumento consistente de la actividad durante el periodo de incubación.

Las cepas que presentaron actividad ligninolítica de LiP fueron HBC7, HBC9 y M1H5, confirmando la prueba cualitativa. La cepa HBG no presentó actividad para esta enzima con ninguno de los soportes. Se observó que la cepa HBC7 mostró la mayor actividad en la última semana de incubación con olote, sin embargo, su comportamiento durante todo el periodo de muestreo no fue consistente ya que se observó actividad en la segunda semana de crecimiento, pero disminuyó en la tercera semana. Con la madera la actividad ligninolítica no fue importante. En comparación la cepa M1H5, mostró un aumento progresivo de la actividad ligninolítica con el olote como soporte desde la primera hasta la tercera semana de crecimiento y en la cuarta semana se aprecia una disminución de la actividad. Con la madera se observó la mayor actividad ligninolítica en la tercera semana de crecimiento. No obstante, en la primera, segunda y cuarta semana se observa una baja actividad ligninolítica (Figura 5).



**Figura 5.** Actividad relativa de LiP. La cepa M1H5 muestra una actividad consistente con ambos soportes de crecimiento

### Conclusiones

Las cuatro cepas crecieron en los soportes de madera y olote, sin embargo en el olote mostraron un mejor desarrollo en menor tiempo, por lo que se recomienda utilizar este soporte para el crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo.

En las pruebas cualitativas de la actividad ligninolítica la cepa HBG dió positivo para la prueba de Lac y MnP. Las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 resultaron positivas para la prueba de LiP.

Para la determinación de la enzima Lac, la cepa HBG mostró la mayor actividad ligninolítica con el olote como soporte; las tres cepas restantes no presentaron actividad para esta enzima.

En la prueba con MnP las cuatro cepas mostraron actividad enzimática, siendo la cepa HBG crecida en olote la que presentó una actividad consistente durante las cuatro semanas de crecimiento.

En el caso de la enzima LiP las cepas HBC7, HBC9 y M1H5 crecidas en olote mostraron actividad; la cepa M1H5 presentó una actividad consistente durante las tres primeras semanas de crecimiento.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Metropolitana por el soporte financiero otorgado a través del proyecto (CB027-13).

### Referencias

Acevedo F., Pizzul L., Castillo M. P., Cuevas R., Diez M. C. (2011). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 185: 212-219.

Bautista Z. F. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados. Vol. 1. Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán México, 1: 22-29.

Call H. P., Mücke I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology*, 53: 163-202.

Cruz Colín M., Cuevas Díaz M., Sánchez Díaz L., Rodríguez Sena J., Alamina Neyra G., Castañeda Briones M. T., Ávila Jiménez M., García Franco F. (2011). Perfil microbiano durante el proceso de composteo de hidrocarburos adicionando residuos de caña de azúcar. 20 Conferencia de Química. Santiago de Cuba, Cuba.

Gan S., Lau E. V., Ng H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. 172: 532-549.

García Oduardo N., Bermúdez Savón R. C., Téllez Suarez I., Chávez Toledano M., Perraud Gaime I. (2017). Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus* spp. *Tecnología Química*. 37: 33-39.

Harvey J. P., Christopher T. F. (2001). The biochemistry of ligninolytic fungi. Editorial G. M. Gadd. 1ª Edición. p. 27-51.

Jiménez B. R. (2017). Introducción a la contaminación de suelos. Editorial Mundi-Prensa. 1ª Edición. p. 50-60.

Juárez Díaz O. G. (2014). Estudio del efecto del pH en la degradación de hidrocarburos en suelos con hongos. Proyecto Terminal en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. México.

Kapich A. N., Prior B. A., Botha A., Galkin S., Lundell T., Hatakka A. (2003). Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 187-195.

Kubicek C. P. (2012). Fungi and Lignocellulosic Biomass. Editorial Wiley-Blackwell. 1ª Edición. p. 30-45.

Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y. B., Naidu R., Megharaj M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168: 944-968

Steffen K. T., Hofrichter M., Hatakka A. (2000). Mineralisation of <sup>14</sup>C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 819-825.

Tien M., Kirk T. K. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161: 238-248.

Wan C., Li Y. (2012). Fungal pretreatment lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30: 1447-1457.

Wolfenden B. S., Wilson R. L. (1982). Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc.*, 2: 805-812.