

Actividad ligninolítica de hongos aislados de suelo contaminado con hidrocarburos crecidos en tres soportes ligninocelulósicos

Ávila Jiménez Miguel¹, Castaños Núñez Alitzel, Cruz Colín María del Rocío¹,
Castañeda Briones María Teresa¹, Cuevas Díaz María del Carmen²

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Departamento de Ciencias Básicas.
Av. San Pablo No. 180. Col. Reynosa Tamaulipas, México, D.F. CP 02200.

²Universidad Veracruzana, Campus Coatzacoalcos. Facultad de Ciencias Químicas,
Av. Universidad Veracruzana Km 7.5, Paraíso Coatzacoalcos,
Coatzacoalcos, Ver. México, CP 96538.

miaj@correo.azc.uam.mx

Fecha de aceptación: 26 de junio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Se realizó el crecimiento de cinco cepas de hongos (F, HBG, HBC9, HBC12 y M1H5), en tres soportes ligninocelulósicos; aserrín de pino, bagazo de caña y pasto, para observar su desarrollo y determinar la actividad enzimática de Lacasa, Lignina Peroxidasa y Manganese Peroxidasa con el propósito de evaluar su posible aplicación en la restauración de suelos contaminados con hidrocarburos. A partir de cultivos desarrollados en los soportes ligninocelulósicos se obtuvieron extractos enzimáticos para determinar su actividad ligninolítica. Las mayores actividades para Lacasa se presentaron en aserrín y bagazo con las cepas F, HBG y M1H5 mientras que para Lignina Peroxidasa se observaron en aserrín con las cepas HBG, M1H5 y HBC12. Todos los extractos presentaron actividad de Manganese Peroxidasa dando los mejores resultados en el bagazo con las cepas HBG, F y M1H5. Los cinco extractos de las cepas presentaron actividad enzimática por lo menos para una enzima. Las cepas HBG y M1H5 dieron actividad para las tres enzimas.

Palabras clave: hongos ligninolíticos, soportes ligninocelulosicos, actividad de: lacasa, lignina peroxidasa y manganese peroxidasa.

ABSTRACT

Five fungi strains (F, HBG, HBC9, HBC12 and M1H5) were grown on three ligninocellulosic supports: sawdust of pine, cane bagasse and green grass to assay enzymatic activities for Lacasse, Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase as a test of the possible application in the use of remediation of polluted soils with hydrocarbons. From cultures growth on ligninocellulosic materials, enzymatic extracts were prepared. The highest activities for Lacasse were using sawdust and bagasse with the strains F, HBG and M1H5, while for Lignin Peroxidase were using sawdust with the strains HBG, M1H5 and HBC12. All extracts showed activity for Manganese Peroxidase. The highest activity for Manganese Peroxidase was on bagasse with the HBG, F and M1H5. The five strains showed enzymatic activity at least for one enzyme the best ones being HBG, F and M1H5. The strains HBG and M1H5 showed activity for three enzymes.

Key words: ligninolytic fungi, ligninocellulosic supports, activity of Lacasse, lignin peroxidase, and manganese peroxidase.

INTRODUCCIÓN

Los hongos ligninolíticos, así como sus enzimas, tienen potencial aplicación en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas, porque la baja especificidad de estas enzimas les permite oxidar una amplia variedad de compuestos xenobioticos. Las enzimas degradadoras de lignina comprenden principalmente tres tipos: lignina Peroxidasa (LiP), Manganese Peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lcc). En la biorremediación de suelos, los hongos ligninolíticos normalmente son aplicados en forma de micelio crecido sobre algún material ligninocelulósico. Esta forma de inoculación permite obtener una abundante colonización del suelo, mantener su crecimiento por un periodo prolongado dado su aporte de carbono y favorecer la producción de enzimas ligninolíticas (Quintero *et al.*, 2006).

El objetivo del presente trabajo es observar el crecimiento de cinco cepas de hongos en tres tipos de soporte y determinar su actividad ligninolítica para seleccionar un soporte y una cepa que pueda ser utilizada para la restauración de un suelo contaminado.

METODOLOGÍA

Se utilizaron cinco cepas de hongos, las cuales forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM-A. Una cepa (F) fue aislada de madera en descomposición (Garzón y Rodríguez, 2009) y las cuatro restantes (HBG, HBC9, HBC12 y M1H5) fueron aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos (Cruz Colín *et al.*, 2011). Se preparó una suspensión de esporas de cada cepa a partir de cultivos desarrollados en agar extracto de malta durante dos semanas a temperatura ambiente. Se utilizó un medio salino estéril para preparar la suspensión de esporas cuya composición por litro fue: 5.0 g glucosa, 2.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g CaCl_2 y 0.5 g de tartrato de amonio (Steffen *et al.*, 2000)

Los soportes ligninocelulósicos que se utilizaron para evaluar el crecimiento de los hongos fueron: residuos de jardinería (pasto), aserrín de pino y bagazo de caña. Se agregaron 10 g de soporte en base seca, en un recipiente de vidrio de 450 mL de capacidad. El pasto y bagazo fueron humedecidos con medio salino en una proporción de 5.0 mL de medio/g de soporte; para el aserrín la relación fue de 3.0 mL de medio/g de soporte. Los recipientes con los soportes fueron esterilizados en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Las botellas con soporte estéril fueron inoculadas en condiciones asépticas con 50 mL de la suspensión de esporas y fueron mantenidas a temperatura ambiente durante cinco semanas. Cada hongo fue sembrado por duplicado en los tres soportes.

Para la determinación de la actividad enzimática se prepararon extractos con los cultivos desarrollados en los soportes ligninocelulósicos, agregando a cada botella en condiciones asépticas, 100 mL de solución buffer de tartrato al 0.25 M, pH 3.5 adicionado con tween 80 al 0.05%. Se agitó durante una hora, centrifugado a 12000 rpm por 12 minutos y filtrado por papel. Los extractos fueron conservados en refrigeración hasta el momento de ser utilizados.

Para medir la actividad enzimática se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV1800. La actividad de Lacasa (Lcc) fue determinada por la oxidación del 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) a 436 nm (Wolfenden y Wilson, 1982). La actividad de Lignina Peroxidasa (LiP) se determinó por la conversión del alcohol veratrílico a veratrilaldehído a 310 nm (Tien y Kirk, 1984). La actividad de Manganese Peroxidasa (MnP) se determinó por la oxidación del 2, 6-dimetoxifenol (DMP) a 3,3', 5,5'-tetrametoxidifenolquinona a 469 nm (Kapich *et al.*, 2004). En todos los casos se midió la actividad enzimática como el incremento de absorbancia a la longitud de onda señalada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó crecimiento de todas las cepas en los tres soportes después de una semana de incubación. El crecimiento de las cepas en aserrín únicamente se presentó en la superficie debido a que se compactó este material. En general, se presentó mayor crecimiento en bagazo y pasto en comparación con el observado en aserrín debido a que estos materiales no se compactaron y presentaron una mayor área. De acuerdo al comportamiento observado en los soportes, el crecimiento de las cepas puede ordenarse en la siguiente forma: F > HBG > M1H5 > HBC12 > HBC9.

En la figura 1 se observa cómo la actividad enzimática de Lcc se vio favorecida en aserrín en comparación con bagazo y pasto. El hongo F presentó la mayor actividad en aserrín. Los hongos HBG y M1H5 mostraron actividad tanto en aserrín como en bagazo, mientras que el hongo HBC9 solo presentó actividad en aserrín.

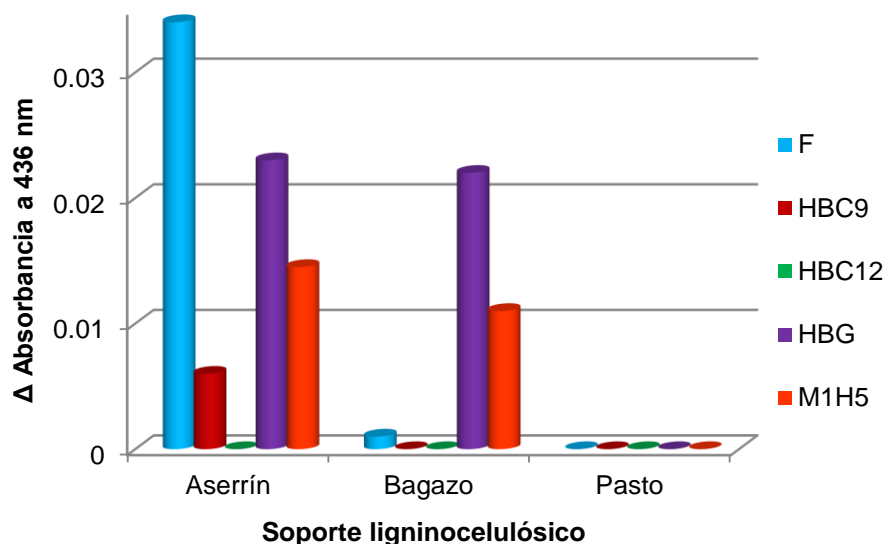


Figura 1. Actividad de la enzima Lcc para las diferentes cepas.

Actividad enzimática de LiP únicamente se observó en aserrín (Figura 2). Las cepas de los hongos HBG, M1H5 y HBC12 mostraron actividad para esta enzima.

En la figura 3 se observó actividad enzimática de MnP en los tres soportes probados. En bagazo, los hongos F y HBG fueron los que presentaron mejores resultados, siendo HBG el de mayor actividad. En aserrín, todas las cepas presentaron actividad muy similar. En pasto se observó ligera actividad de las cepas HBG y M1H5. Es importante señalar que la enzima MnP fue la única que se detectó en los tres soportes.

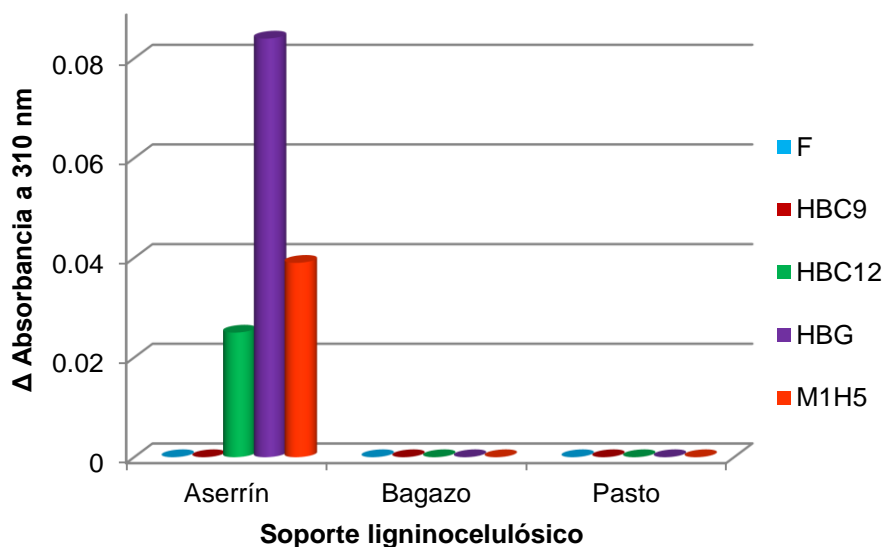


Figura 2. Actividad de la enzima LiP para las diferentes cepas.

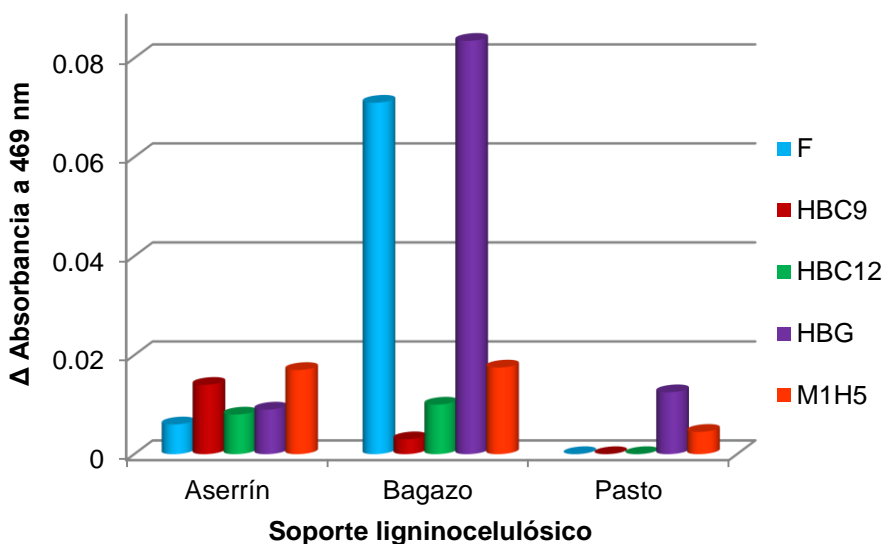


Figura 3. Actividad de la enzima MnP para las diferentes cepas.

Con el propósito de comparar los resultados de la actividad enzimática entre las cepas, se calculó la actividad relativa de cada enzima tomando como 100% la mayor actividad observada. Los gráficos que se presentan en la Figura 4 consideran sólo a las cepas que presentaron las mayores actividades relativas en aserrín y bagazo de caña. La cepa HBG presentó la mayor actividad para LiP en aserrín y para MnP en bagazo, además de dar una actividad relativa de Lcc mayor al 60% en bagazo y aserrín.

Estos resultados muestran algunas coincidencias con los encontrados por Quintero *et al.* (2006) utilizando otros hongos; la menor actividad enzimática detectada se observó en pasto, mientras que la mayor actividad de los hongos estudiados se produce en madera. El principal factor al cual se le atribuye este resultado es a la relación carbono-nitrógeno de los materiales.

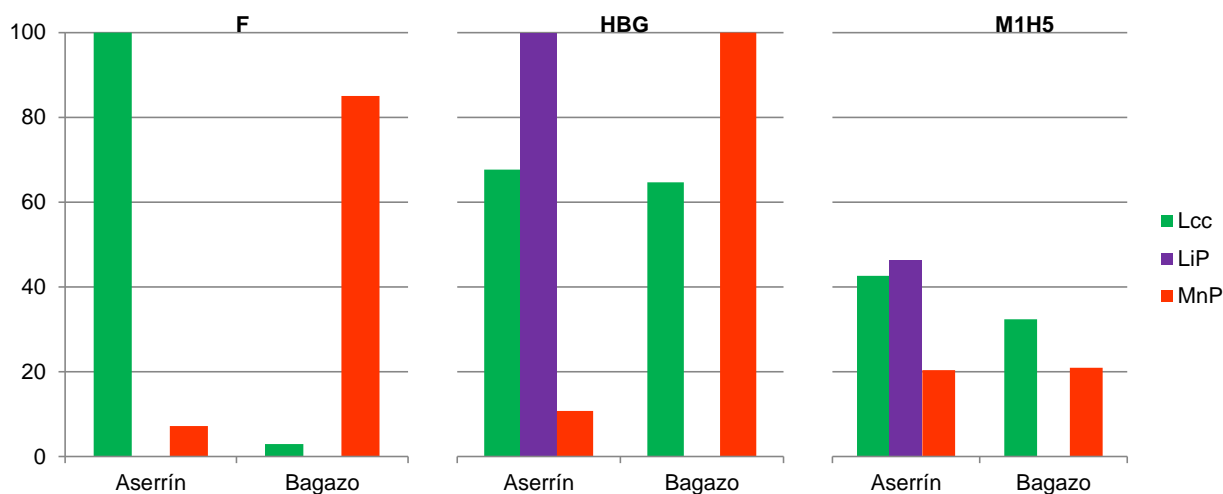


Figura 4. Mayor actividad relativa observada para las cepas: F, HBG y M1H5.

CONCLUSIONES

Las cinco cepas tuvieron buen crecimiento en los tres soportes desde la primera semana de incubación. La cepa F fue la que presentó el mejor crecimiento en los soportes ligninocelulósicos seguido por las cepas HBG y M1H5. Los mayores valores de actividad enzimática se dieron para las enzimas LiP en aserrín y MnP en bagazo. Actividad para la enzima Lacasa se observó solamente en aserrín. Las cepas HBG, F y M1H5 fueron las que mostraron mayor actividad enzimática en las tres enzimas evaluadas, por lo que puede concluirse que tienen capacidades potenciales para degradar hidrocarburos. El conjunto de resultados hace de la cepa HBG la seleccionada para realizar los estudios de remediación en suelo contaminado con hidrocarburos utilizando como soporte para su crecimiento bagazo de caña.

REFERENCIAS

Cruz Colín M. R., Cuevas Díaz M. C., Sánchez Díaz L.F., 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. Cuba.

Garzón Ramírez L., Rodríguez Hernández L. I. (2009). Remoción de hidrocarburos totales del petróleo utilizando hongos ligninolíticos aislados de madera silvestre. Proyecto Terminal de Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. México.

Kapich A. N., Prior B. A., Botha A., Galkin S., Lundell T., Hatakka A. (2004). Effect of ligninocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enz. Microbial Technol.*, 34: 187-195.

Quintero D., J. C., Feijoo C., G., Lema R., J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales ligninocelulósicos. *Vitea*, 13: 61-67.

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

Tien M., Kirk T (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 2280-2284.

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-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2: 805-812.