

Tesis Doctoral

# Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación

Kuhar, José Francisco

2013-03-20

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kuhar, José Francisco. (2013-03-20). Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Kuhar, José Francisco. "Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-20.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

## **Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

**José Francisco Kuhar**

Director de tesis: Dr. Víctor Leandro Papinutti

Consejero de Estudios: Dra. Silvia Edith López

Buenos Aires, 2012

# **Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación.**

## ***Resumen***

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst es un hongo causante de pudrición blanca y por consiguiente es capaz de degradar la lignina de la madera y otros sustratos sobre los que crece. Se evaluó su capacidad de producir las enzimas ligninolíticas Lacasa, Manganese peroxidasa y lignin peroxidasa, encontrándose que sólo la lacasa se produce con una actividad apreciable. Se evaluó la inducción con metales pesados y compuestos fenólicos y se determinó que entre las sustancias ensayadas, el cobre y el ácido ferúlico son los mejores inductores de la lacasa. Se evaluaron fuentes de carbono y nitrógeno a fines de proponer un medio consistente en glucosa, peptona, extracto de levadura, cobre ya ácido ferúlico óptimo para la producción de esta enzima y a través de diseños factoriales se obtuvieron optimizaron las concentraciones de los mismos. Se encontró además que los dos tipos de inductores (fenólicos y metálicos) producen distintos patrones electroforéticos de actividad lacasa. Se optimizó la producción de cuerpos fructíferos en medios basados en aserrín de pino y álamo con y sin chips de esas maderas, concluyendo que la mayor bioconversión (peso seco de fructificaciones / peso seco de sustrato) se encuentra sobre aserrín de álamo con chips. Se evaluaron los componentes de los sustratos nuevos y gastados así como también los de la fructificación para caracterizar la bioconversión y se cuantificaron las actividades enzimáticas ligninolíticas e hidrolíticas. Se estudió la degradación de colorantes industriales por medios líquidos y sólidos y se evaluó el efecto de los mediadores de oxidorreducción HBT y ABTS. Se encontró que los compuestos fenólicos vainilloides producen un efecto protector sobre el micelio contra distintos xenobióticos por vías distintas de la inducción enzimática y se concluyó que el mecanismo consiste en la alteración de la matriz extracelular del micelio incrementando su capacidad para retener los tóxicos.

# **Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. and evaluation of its application to bioremediation.**

## ***Summary***

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst is a white rot fungus and therefore is able to degrade the lignin of wood and other substrates on which it grows. The ability to produce the ligninolytic enzymes laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase were assessed. It was found that only laccase occurs with appreciable activity. Induction with heavy metals and phenolic compounds was evaluated and it was found that among the tested substances, copper and ferulic acid are the best inductors of laccase. Carbon and nitrogen sources were evaluated and an optimal medium consisting of glucose, peptone, yeast extract, ferulic acid and copper was proposed for production of this enzyme. Optimized concentrations were obtained through a factorial design. It was also found that the two types of inductors (phenolic and metallic) produce different electrophoretical patterns of laccase activity. Production of fruit bodies in media based on poplar pine sawdust with and without wood chips of those species were optimized. We concluded that the most efficient bioconversion (dry weight of fruit bodies / dry weight of substrate) is achieved on poplar sawdust with wood chips. Chemical composition of fresh and wasted substrates as well as of fruit bodies were analyzed to characterize the bioconversion. Hydrolytic and ligninolytic enzyme activities were quantified. Degradation of industrial dyes for liquid and solid media were studied and the effect of redox mediators HBT and ABTS was evaluated. It was found that the vanilloid phenolic compounds exert a protective effect on the mycelium against various xenobiotics by pathways which are different from that of enzyme induction and it was concluded that the mechanism involves the alteration of the extracellular matrix of mycelium by increasing its ability to retain toxic substances.

***Dedicada a mi mamá, por enseñarme a leer todo.***

## **Agradecimientos**

A mi director Leandro, por su trabajo, su conocimiento, su paciencia infinita, por haberme ayudado con esta tesis y con mi formación y en especial por la motivación constante para poder llevar a cabo este y otros trabajos.

A todo el resto del equipo de micología experimental: Flavia, Laura, Marcela, Isabel, Eugenia, Emanuel, Valeria, Raúl, Maira, Ruth, Nora, Luis y Ester. Por haber sido como una familia en el trabajo. Por enseñarme tantas cosas y por el afecto constante.

A Alejandra y Laura, por traerme a esta facultad y a este equipo.

A Virginia Bianchinotti, porque sin su ayuda no sería biólogo.

A Silvia López, mi consejera de estudios, por todos los conocimientos que me transmitió.

A los todos colegas del cuarto piso y personas que me ayudaron con mi trabajo como docente.

A mi familia, por comprender los tiempos y las ausencias que implican trabajar lejos de ellos y por la libertad para elegir la vocación.

A Pablo y a mis amigos: por darme siempre paz y ganas de seguir cuando no tengo voluntad.

# índice

	pág.
Capítulo 1: producción de lacasa en medio líquido	9
1.1 Introducción	9
1.1.1 La lacasa	9
1.1.2 Las peroxidasas	13
1.1.3 Las enzimas modificadoras de la lignina de <i>Ganoderma lucidum</i> .	13
1.2 Materiales y Métodos	14
1.2.1 Las cepas	14
1.2.2 Medios de cultivo	14
1.2.3 Determinaciones analíticas	16
1.2.4 actividades enzimáticas	17
1.2.5 Separación electroforética	18
1.2.6 Ensayos de termoestabilidad	21
1.2.7 Procesamiento de los datos	21
1.3 Resultados:	22
1.3.1 Peroxidasas	22
1.3.2 Lacasa	22
1.3.2.1 Ensayos de inducción en medio agarizado	22
1.3.2.2 Crecimiento en medio líquido e inducción	24
1.3.2.3 Efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	28
1.3.2.4 Separación electroforética de las isoenzimas.	30
1.3.2.5 Optimización de la producción de lacasa	33
1.3.2.6 Termoestabilidad	44
1.3.2.7 Actividad lacasa frente a distintos sustratos	46
1.3.2.8 Dinámica de Michaelis – Menten aparente	48
1.4 Discusión	49
Referencias	51

Capítulo 2: fructificación	54
2.1 Introducción	54
2.2 Materiales y métodos	56
2.2.1 Inóculo inicial	57
2.2.2 Semilla (inóculo)	56
2.2.3 Medio (sustrato) sólido	56
2.2.4 Inoculación	57
2.2.5 Mantenimiento de los cultivos	57
2.2.6 Cosecha y conservación de las fructificaciones	58
2.2.7 Determinación de composición y extractivos	58
2.2.8 Ensayos de enzimas	59
2.2.9 Análisis estadístico	61
2.3 Resultados	62
2.3.1 El inóculo	62
2.3.2 Los cultivos	62
2.3.3 Caracterización de la bioconversión.	68
2.3.4 Caracterización del crecimiento en medio sólido	69
2.3.5 producción de enzimas hidrolíticas	71
2.3.6 Cultivos en presencia de cobre	73
2.3 Discusión	78
Referencias	80
Capítulo 3: Degradación de colorantes industriales	82
3.1 Introducción	82
3.2 Materiales y Métodos	86
3.3 Resultados	88
3.3.1 Ensayos en medio agarizado	88
3.3.2 Ensayos con sobrenadante de cultivo en medio líquido.	92
3.3.3 Ensayos con cultivos en medio sólido	97
3.3.4 Ensayo de detoxificación	105



3.4 discusión	107
Referencias	109
Capítulo 4: Efecto de los Vainilloides en la resistencia a estrés químico.	112
4.1 Introducción.	112
4.2. Materiales y métodos	114
4.2.1. Cepas de hongos y condiciones de cultivo	114
4.2.2. Screening de compuestos aromáticos en placas de agar.	114
4.2.3 Ensayos de toxicidad en las placas	115
4.2.4 Ensayos en medio líquido	115
4.2.5 Ensayos de adsorción	116
4.2.6 Estudios cinéticos	116
4.2.7 Determinación de cadmio	117
2.2.8 Los análisis estadísticos	117
4.3 Resultados	118
4.3.1 Ensayos de crecimiento en placa	118
4.3.2 Crecimiento en medio líquido	122
4.3.3 Efecto de la dosis de ácido vainílico	124
4.3.4 Screening de compuestos aromáticos protectores	126
4.3.5 Ensayos de adsorción	127
4.3.6 Capacidad de adsorción de ECMM	128
4.3.7 Adsorción de cadmio	131
4.3.8 Estructura de los compuestos protectores	132
4.4 Discusión	134
Referencias	138

# Capítulo 1: producción de lacasa en medio líquido

## 1.1 Introducción

### 1.1.1 La lacasa

Los hongos de la pudrición blanca (white rot fungi) se caracterizan por su capacidad de degradar la lignina. Dado que esta consiste en un heteropolímero compuesto por unidades de diferente estructura (en general compuestos fenólicos) se requiere de enzimas especiales que sean capaces de oxidar estos enlaces sin alta especificidad pero de manera eficaz. Estas enzimas se conocen como ligninasas o más recientemente, como enzimas modificadoras de la lignina. Si bien existen algunas otras descritas, los estudios clásicos reconocen principalmente a la Lacasa, a la Lignin peroxidasa (LiP) y a la Manganese peroxidasa (MnP).

La Lacasa es una de las pocas enzimas cuya investigación se remonta al siglo XIX. Fue encontrada por primera vez en los exudados de *Rhus vernicifera*, el árbol de la laca japonesa y, años más tarde, también en los hongos (1). A pesar de su temprano descubrimiento, ha atraído considerable atención sólo después del comienzo de los estudios de degradación enzimática de la madera por los hongos de la pudrición blanca aproximadamente a partir de la segunda mitad de los '90.

Las lacasas se encuentran en muchas plantas, hongos y microorganismos, son oxidasas que se caracterizan por poseer cuatro átomos de cobre funcionales distribuidos en tres sitios y definidos de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas. Pueden ser poliméricas, y la forma enzimáticamente activa puede ser un dímero o trímero. Al igual que las otras enzimas modificadoras de la lignina, la lacasa no actúa directamente sobre el sustrato sino a través de mediadores de oxidorreducción presentes en el medio. Es una enzima perteneciente a un grupo de polifenol oxidasas que contienen átomos de cobre en

el centro catalítico y generalmente se las conoce como oxidasas multicobre. Cataliza oxidaciones que involucran 4 electrones del sustrato reductor esta reacción está acoplada a la reducción del  $O_2$  para llevarlo a  $H_2O$ . La Lacasa puede catalizar directamente la oxidación de *o*-difenoles, *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas y arildiaminas Es difícil definir lacasa por su sustrato debido a la diversidad, y el solapamiento con otras fenol oxidasas, aunque suele considerarse a la siringaldazina como sustrato característico (2) siempre y cuando el peróxido de hidrógeno se excluya de la reacción. La lacasa es, pues, una oxidasa que oxida un amplio rango de sustratos y una variedad de otros compuestos, así como también sobre el heteropolímero de la lignina, pero no tiene actividad oxidasa sobre la tirosina como lo hacen las tirosinasas. Debido a que también puede estar involucrada en reacciones de polimerización promoviendo el acoplamiento oxidativo de monolignoles, una familia de fenoles de origen natural, es más correcto referirse a ella como enzima modificadora de la lignina que como ligninasa. Se demostró además que las lacasas de los hongos tienen una gran diversidad de funciones, entre ellas la morfogénesis, la interacción planta patógeno, las respuestas a diversos tipos de estrés y la degradación de la lignina (3).

La actividad lacasa se ha verificado en muchas especies de hongos y la enzima ya ha sido purificada a partir de decenas de ellos. Sin embargo, esta producción está limitada a determinados grupos ecológicos y nunca se ha demostrado fehacientemente, por ejemplo, en los hongos inferiores.

En casi todas las especies de hongos de podredumbre blanca se informó la producción de lacasa en diversos grados (4). En el caso de *Pycnoporus cinnabarinus*, la lacasa fue descrita como la única enzima producida por esta especie capaz de degradar la lignina (5). La presencia y el papel de las lacasas en hongos de pudrición castaña todavía no están claros, pero parece ser poco común dado que su estrategia ecológica consiste en la degradación de la celulosa. No hay en ellos degradación (mineralización o al menos solubilización) de lignina sino una notable modificación llevada a cabo por mecanismos no enzimáticos como por ejemplo la reacción Fenton.

La mayoría de los hongos de pudrición blanca exhiben al menos dos isoenzimas de la lacasa (1), y en algunos casos más, tal como *P. ostreatus* que produce al menos ocho isoenzimas lacasa diferentes, seis de los cuales se han aislado y caracterizado (6-10). La producción de las isoenzimas de lacasa en *P. ostreatus* está regulada por la presencia de cobre y las dos isoenzimas diméricos sólo se han detectado en la presencia de cobre (9-11)

La base molecular para la producción de distintas isoenzimas es la presencia de múltiples genes de lacasa en hongos, ver por ejemplo, Chen et al. (12-14).

Las lacasas pertenecen al grupo de las oxidasas multicobre azules (BMCO) que catalizan una oxidación de un electrón de forma concomitante con la reducción de cuatro electrones de oxígeno molecular a agua (15-17). La catálisis realizada por todos los miembros de esta familia depende de la presencia de centros de cobre diferentes en la molécula de la enzima, en las lacasas siempre son 3. Estos centros pueden ser identificados sobre la base de sus propiedades espectroscópicas. El cobre T1 se caracteriza por una fuerte absorción alrededor de 600 nm, debido a su intenso color azul, mientras que el cobre T2 exhibe una absorción débil en la región visible. El sitio T2 emite resonancia paramagnética electrónica (EPR-activo), mientras que los dos iones de cobre del sitio T3 son EPR-silencioso debido a un acoplamiento puente del tipo antiferromagnético. Los sustratos son oxidados por el cobre T1 y los electrones extraídos se transfieren, probablemente a través de un *motif* muy conservado His-Cys-His, al sitio T2/T3, donde se reduce el oxígeno molecular dando lugar a agua (18). Algunas enzimas carecen del cobre T1 y algunos autores no las consideran verdaderas lacasas. Otros utilizan el término “lacasas amarillas”, porque estas variantes no tienen la banda de absorción característica en torno a 600 nm (19, 20).

A pesar de la cantidad de información sobre estas enzimas, ni la vía precisa de transferencia de electrones ni los detalles de la reducción de dioxígeno se entienden completamente (9, 21). Por lo que la relación entre la estructura del sitio catalítico y la preferencia de sustrato sigue siendo dudosa.

Una gama muy amplia de sustratos se ha demostrado que se oxida por las lacasas fúngicas, pero las constantes catalíticas se ha informado sobre todo para

un pequeño grupo de sustratos - por ejemplo, los no naturales como el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS) y los compuestos fenólicos 2,6 - dimetoxifenol (DMP), guayacol y siringaldazina. Los valores de Km oscilan entre 10 mM para siringaldazina y ABTS a 100 mM para DMP y guayacol.

Los valores de pH óptimos para la actividad de las lacasas fúngicas se ubican típicamente en rangos ácidos. Por ejemplo el pH óptimo para la oxidación de ABTS es generalmente inferior a 4,0, los compuestos fenólicos como el DMP, guayacol y siringaldazina presentan valores más altos de entre 4,0 y 7,0. pH óptimos de las enzimas de diferentes hongos para la hidroquinona y catecol son 3,6–4,0 y 3,5–6,2, respectivamente (22).

La estabilidad de las lacasas fúngicas es generalmente más alta a pH ácido (23), aunque existen excepciones (24). La estabilidad en función de la temperatura varía considerablemente. La vida media a 50°C varía desde minutos en *B. cinnerea*, a más de 2–3 h en *L. edodes* y *A. bisporus*, a un máximo de 50–70 h en *Trametes* sp. (25). Mientras que la enzima de *G. lucidum* se inactivó inmediatamente a 60°C según reporta Baldrian (1), la lacasa termoestable de *M. albomyces* exhibe una vida media de más de 5 h y por lo tanto un potencial muy alto para determinadas aplicaciones biotecnológicas (26).

Se propuso también que las lacasas cumplirían un papel en la protección contra los metales pesados, basado en el hecho de que diferentes metales pesados inducen su actividad y a su vez está conectado con la producción de melaninas a través de la polimerización de compuestos fenólicos (27-30).

El desarrollo actual en la investigación de la catálisis llevada a cabo por la lacasa y el relevamiento y estudio de mediadores junto con la investigación sobre la expresión heteróloga de esta enzima abre un amplio espectro de posibles aplicaciones en el futuro próximo. Por otra parte, las lacasas también pueden ofrecer una alternativa más simple y conveniente que las peroxidasa (las cuales además requieren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ya que las lacasas se pueden producir en una escala económicamente factible.

### **1.1.2 Las peroxidasas**

La lignina peroxidasa y la manganoso peroxidasa son enzimas con actividad ligninolítica frecuentemente encontradas en hongos de pudrición blanca. Actúan también de manera indirecta pero el agente oxidante principal no es el oxígeno sino el peróxido de hidrógeno. En el caso de la manganoso peroxidasa, esto ocurre a través de la oxidación y reducción del manganoso



Si bien en muchos hongos son responsables de gran parte de la degradación de la lignina, no hay muchos reportes de su producción por parte de *G. lucidum* (31).

Las peroxidasas son enzimas de menor factibilidad de aplicación industrial debido a su inestabilidad y a la dependencia de una fuente externa de peróxido de hidrógeno, lo que restringe su acción a condiciones más estrictas que la lacasa.

### **1.1.3 Las enzimas modificadoras de la lignina de *Ganoderma lucidum*.**

La producción de enzimas ligninolíticas por parte de *Ganoderma lucidum* fue estudiada en las últimas décadas con especial énfasis en la actividad lacasa debido a la escasa producción de Mn peroxidasa y Lignin peroxidasa (32-35) en varias especies de este género se verificó la alta producción de lacasa en medio sólido pero también existen estudios en los que se verifican altas actividades en medio líquido (32, 36). Las actividades peroxidasa reportadas en la literatura son escasas y refieren bajos niveles de MnP y solo raramente LiP a pesar de que el genoma de *G. lucidum* presenta secuencias similares a la del gen de esta última (31). La inducción de la actividad lacasa por compuestos fenólicos se conoce en muchos géneros de hongos lignocelulolíticos y también existen reportes para *G. lucidum* (37). En otros géneros de hongos de la pudrición blanca ha sido muy estudiada también la inducción de esta enzima por metales como el cobre en

*Trametes trogii* (38). Hasta el momento no hay reportes publicados sobre la inducción de la actividad lacasa en *Ganoderma lucidum*.

## **1.2 Materiales y Métodos**

### **1.2.1 Las cepas**

Se utilizaron las cepas de *Ganoderma lucidum* E47 y S provenientes del cepario del CERZOS Bahía Blanca y se las mantuvo en medio extracto de malta agarizado a lo largo de todo el trabajo.

### **1.2.2 Medios de cultivo**

Para los ensayos de nutrición e inducción previos a la optimización se utilizó el medio GG modificado de Galvagno (39) como sigue:

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.5 g/l, HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.6 g/l, H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 0.5 g/l

Solución de micronutrientes A\* : 2 ml

Solución de micronutrientes B\* :2 ml

Tiamina y Biotina \*\*

\* Micronutrientes:

Soluciones madre:	Cantidades en el medio basal (/L):
A: CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 200 mg	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O: 0,4 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O 45 mg	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O: 0,09 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 35 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : 0,07 mg
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 10 mg	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O: 0,02 mg
ZnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O 1.75 g	ZnCl <sub>2</sub> : 2,5 mg
B: FeCl <sub>3</sub> 500 mg	FeCl <sub>3</sub> 1,0 mg

\*\* Vitaminas:

Soluciones madre:	Cantidades en el medio basal (/L):
Hidrocloreuro de tiamina: 1 mg/ml	Tiamina 100 µg
Biotina: 100 µg/ml	Biotina 5 µg

Fuentes de carbono y nitrógeno

Glucosa	10 g/l
Ácido glutámico	8 g/l

GG agarizado: agar: 20 g

Para los ensayos de optimización se utilizó un medio de cultivo que consistió en una suspensión de extracto de levadura (10 g/l) como fuente de vitaminas, 40 g/l de glucosa y las cantidades de ácido ferúlico, sulfato de cobre (como inductores) y



peptona (como fuente de nitrógeno) que se detallan en la tabla 1 para cada punto del diseño factorial de Doehlert.

cultivo	peptona		cobre		ác. ferúlico	
	transformado	g/l	transformado	mM	transformado	mM
a	0	12	0	1	0	1
b	0	12	1	2	0	1
c	866	24	0,5	1,5	0	1
d	289	16	0,5	1,5	816	1,9
e	0	12	-1	0	0	1
f	-866	0	-0,5	0,5	0	1
g	866	24	-0,5	0,5	0	1
h	-866	0	0,5	1,5	0	1
i	-289	8	-0,5	0,5	-816	0,1
j	289	16	-0,5	0,5	816	1,9
k	-289	8	0,5	1,5	-816	0,1
l	-577	4	0	1	816	1,9
m	577	20	0	1	-816	0,1

**Tabla 1:** valores reales y transformados calculados para el diseño factorial de Doehlert usando peptona como fuente de nitrógeno y los inductores cobre y ácido ferúlico como factores para optimizar la producción de la enzima lacasa

### **1.2.3 Determinaciones analíticas**

Las proteínas se cuantificaron según el método de Bradford adaptado a proteínas en sobrenadante de cultivos en medio líquido:

Se utilizaron 2,5 ml de Reactivo de Bradford + alícuota del sobrenadante necesario para un buen rango de lectura (entre 5 y 10  $\mu$ l en este trabajo) leyendo a 595 nm contra blanco de Bradford sólo.

La curva patrón se construyó con una solución patrón de BSA 1mg/ml de agua, agregando a los 2,5 ml de reactivo 10, 20, 30, hasta 60 ó 70  $\mu$ l de solución de BSA, y se leyeron las absorbancias. El factor es la inversa de la pendiente de esa curva patrón.

$\text{abs} \times \text{factor} = \mu\text{g de proteínas en los } \mu\text{l usados}$

Los azúcares reductores se midieron según Somogyi-Nelson utilizando 0,5 ml de muestra y 0,5 ml de reactivo de Somogyi en baño 100°C por 15 min, enfriando los tubos en agua. A continuación se agregó el reactivo de Nelson, se agitó y se adicionaron 6 ml agua agitando por inversión. Se leyó a 540 nm contra blanco de agua (0,5 ml de agua destilada + reacción)

Para calcular los micromoles o microgramos equivalentes de azúcar presentes, la curva patrón se hizo con glucosa. El factor es la inversa de la pendiente de la curva de Abs vs  $\mu\text{g}$  de azúcar reductor (o  $\mu\text{moles}$ ). La concentración de azúcar reductor se calculó como: cantidad de equivalentes de azúcar reductor =  $\text{abs} \times \text{factor}$

#### **1.2.4 actividades enzimáticas**

Se calcularon con la siguiente fórmula, siendo  $V_r$  el volumen de reacción,  $V_e$  el volumen de sobrenadante,  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar del producto y  $T_i$  el tiempo de incubación.

$$UE(\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{Abs \cdot V_r(\text{ml})}{\epsilon \cdot V_e(\text{ml}) \cdot T_i(\text{min})}$$

La lignina peroxidasa (LiP) se midió siguiendo el método del azure B (40) modificado como sigue:

Se utilizó como sustrato una solución de 26 mg de Azure B en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (4 mM) la reacción se llevó a cabo en 2,5 ml de buffer tartrato de sodio 50 mM, pH

4.5 + 20  $\mu$ l/tubo del sustrato (conc. final 32  $\mu$ M) + alícuota de sobrenadante (100 – 200  $\mu$ l).

Se inició la reacción con el agregado de  $H_2O_2$  0,1 mM (preparada en el momento de usar: 28  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30% en 20 ml de  $H_2O$ . De esta solución se agregaron 20  $\mu$ l/tubo). Se incubó por 10 min leyendo disminución de absorbancia a 650 nm.

La manganeso peroxidasa (MnP) se midió utilizando rojo fenol como sustrato (10 mg) (41) en 100 ml buffer succinato, pH 4,5,  $SO_4Mn \cdot 4H_2O$ , 22,3 mg. La reacción se llevó a cabo en tubos con 2,5 ml de sustrato + muestra (50-100  $\mu$ l de sobrenadante en este caso). Luego incubó 5-10' en baño a 30°C y se inició la reacción con  $H_2O_2$  0,2 mM (Prepado en el momento de usar: 28  $\mu$ l de  $H_2O_2$  (30% en 10 ml de  $H_2O$ . De esta solución se agregan 20  $\mu$ l/tubo)). Se incubó a 30°C 10 min. Alcalinizando finalmente con 40  $\mu$ l HONa 5N para detener la reacción. Luego de centrifugar se leyó a 610 nm.

La actividad de la enzima lacasa se midió utilizando DMP como sustrato 5 mM en buffer acetato de Na, 0,1 M pH 3,6 (77,1 mg ABTS/ 100 ml buffer Ac-Na, pH 3,6). La reacción se llevó a cabo en tubos conteniendo 2,5 ml de solución de sustrato 5–10 min en baño a 30°C. Agregando la enzima (5–50  $\mu$ l). Se incubó cronometrando y registrando la absorbancia del producto (cerulignona) a 469 nm. Como blanco se utilizó el reactivo solo.

### **1.2.5 Separación electroforética**

La separación electroforética se llevó a cabo en geles preparados como se indica a continuación:

Gel de separación:

agua destilada	5,55 ml
solución B	3,25 ml
solución D (x)	0,13 ml
solución A	4,00 ml
TEMED	6,5 $\mu$ l
Persulfato 10%	65 $\mu$ l

Persulfato amónico. Se disolvieron 50 mg en 500  $\mu$ l de agua al momento de usar.

Gel de concentración (pregel):

Tris pH 6,8, 0,125 M; acrilamida 4%.

Agua destilada	.....	3,05 ml
Solución C	.....	1,25 ml
Solución A	.....	0,65 ml
Solución D (x)	.....	50 $\mu$ l
TEMED	.....	5 $\mu$ l
Persulfato 10%	.....	25 $\mu$ l

Se dejó polimerizar 40 min aprox. Se llenó con el gel concentrador habiendo colocado previamente el peine.

Solución A:	Acrilamida	.....	29,2 g
	Bisacrilamida	.....	0,8 g
	H <sub>2</sub> O hasta.	.....	100 ml

Solución B (Tris HCl 1.5 M, pH 8.8):

Tris base	.....	18,2 g
H <sub>2</sub> O hasta.	.....	100 ml

Se ajustó el pH a 8,8 con HCl 1 N y se llevó a 100 ml.

Solución C (Tris HCl 0,5 M, pH 6,8):

Tris base .....6,1 g

H<sub>2</sub>O hasta. ....100ml

Se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1 N y se llevó a 100 ml.

Solución D (SDS al 10% en agua):

Dodecilsulfato sódico ..... 1 g

H<sub>2</sub>O .....10 ml

Solución E (buffer de muestra):

Agua ..... 2,4 ml

Tris ClH 0.5 M, pH 6.8 ..... 0,6 ml

Glicerol ..... 0,5 ml

SDS 10% ..... 1,0 ml

2-β-mercaptoetanol ..... 0,25

azul de bromofenol 0,05% ..... 0,25 ml

Solución F (buffer de corrida, Tris-glicina, pH 8,3, 5X):

Tris base ..... 15 g

Glicina ..... 72 g

H<sub>2</sub>O ..... 1 L

Se ajustó a pH 8,3 con HCl 1 N y se llevó a 1L, diluyendo 1:5 al momento de usar.

### *Muestras y corrida*

La muestra se utilizó diluida en el buffer de muestra 1:5. En todos los casos se aplicó un voltaje constante de 120 voltios (40-50 mA).

### *Detección de lacasa*

Se fijó el gel de acrilamida en una mezcla de metanol:acético:agua (1:1:1) durante 5 minutos y se sumergió a continuación en una solución de DMP en buffer acetato, pH 3,5, 30 mg/100 ml. Se incubó a temperatura ambiente (25°C) hasta la aparición de bandas de actividad.

### ***1.2.6 Ensayos de termoestabilidad***

Se incubaron las alícuotas (250 µl) de sobrenadantes en tubos Eppendorf de 1,5 ml con y sin buffer en baños térmicos por los tiempos y a las temperaturas que se indica en cada apartado de los resultados. Se extrajo un tubo Eppendorf por cada tiempo de modo de no destapar las muestras de los tiempos subsiguientes de manera que cada medición sea independiente y se cuantificó la actividad como se indica más arriba.

### ***1.2.7 Procesamiento de los datos***

Los gráficos de nutrición e inducción se realizaron, junto con sus correspondientes estadísticos, en software GraphPad Prism. Los gráficos de termoestabilidad se hicieron a partir de planillas de cálculo de Excel y las vidas medias se interpolaron empíricamente. El ensayo de optimización factorial se analizó con el software Statistica. El cálculo de Km se hizo con GraphPad Prism junto con la aproximación a la cinética de Michaelis Menten.

## **1.3 Resultados**

### ***1.3.1 Peroxidasas***

No se detectó actividad lignin peroxidasa ni Mn peroxidasa en ningún sobrenadante de los medios de cultivo indicados en materiales y métodos. En cultivos en medio agarizado en presencia de azure B se produjo decoloración en etapas avanzadas, pero los explantos del medio agarizado no mostraron actividad (ver discusión).

### ***1.3.2 Lacasa***

#### ***1.3.2.1 Ensayos de inducción en medio agarizado***

El ensayo realizado sobre los cultivos en medio GG agarizado consistente en cuantificar la enzima lacasa en discos de agar tomados de cajas de Petri indica que en todos los casos la cepa E47 es mejor productora de lacasa aunque el patrón de inducción por metales y compuestos aromáticos es muy semejante. La figura 1 muestra la inducción en ambas cepas por iones metálicos utilizados en concentración 0,25 mM ya que concentraciones superiores dificultan el crecimiento en este medio. Las actividades fueron medidas en cultivos envejecidos, ya que cultivos más jóvenes no mostraban actividad apreciable. Se observa el mismo patrón en ambas cepas con una superioridad en E47. En los dos casos, el cobre fue el mejor inductor, seguido por el manganeso.

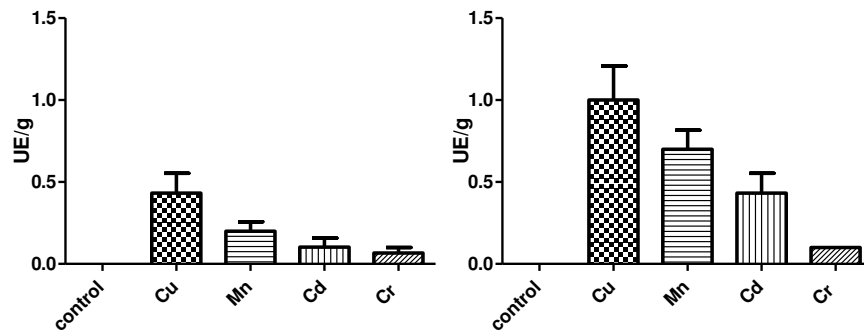


figura 1: actividad lacasa en discos extraídos de cultivos medio agarizado de 20 días de crecimiento con metales (0,25 mM) como inductores. A la derecha se muestra la cepa E47 y a la izquierda la cepa S. Sobre cada barra se representó el desvío estándar .

En la figura 2 se muestran los resultados de la inducción con compuestos aromáticos realizada de la misma manera que en la experiencia anterior, pero en concentración 0,5 mM. En ambos casos el mejor inductor fue el ácido ferúlico, menos marcada fue la inducción por otros compuestos. Al igual que en el experimento con los metales, no se encontraron cantidades medibles de lacasa al día quince, por lo que se esperó al día 20 para tomar las muestras. Se observó además entre los días 15 y 20 un ennegrecimiento del reverso de las placas en todos los aromáticos menos en fenol.

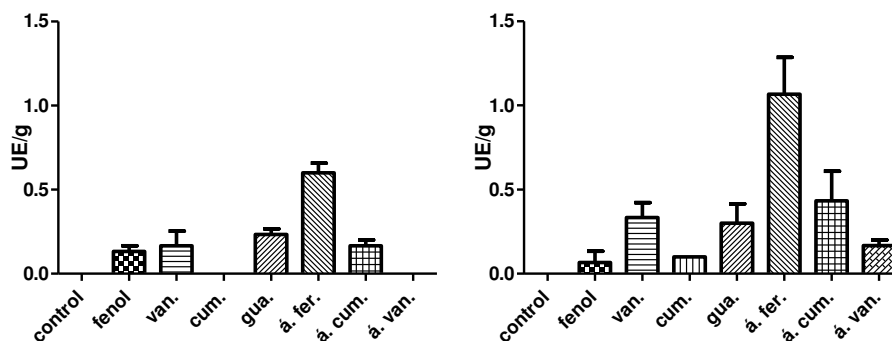


figura 2: actividad lacasa en discos extraídos de cultivos medio agarizado de 20 días de crecimiento con compuestos aromáticos 0,5 (mM) como inductores. A la derecha se muestra la cepa S y a la izquierda la cepa E47. Sobre cada barra se representó el desvío estándar.



Los demás compuestos aromáticos mostraron inducción variable y a la concentración ensayada en este medio, no se notaron efectos de toxicidad apreciables por el crecimiento.

### 1.3.2.2 Crecimiento en medio líquido e inducción

A fines de caracterizar los parámetros de crecimiento en medio líquido, se realizaron curvas de peso seco en función del tiempo en medio GG adicionado con los mejores inductores encontrados en el ensayo anterior. Si bien no mostraron toxicidad en los ensayos con placas, estos compuestos pueden resultar algo tóxicos en medios líquidos donde los hongos son más sensibles, por lo tanto es importante ver el efecto que tienen sobre el crecimiento en las concentraciones de inducción.

La figura 3 muestra las curvas correspondientes a la cepa E47 para el medio GG adicionado con cobre y manganeso y con los fenólicos ácido vainílico y ferúlico. Se utilizaron concentraciones menores del metal que aquellas empleadas en el medio agarizado debido a que en medio líquido el efecto de concentraciones mayores fue negativo. Lo mismo se muestra en la figura 4 para la cepa S.

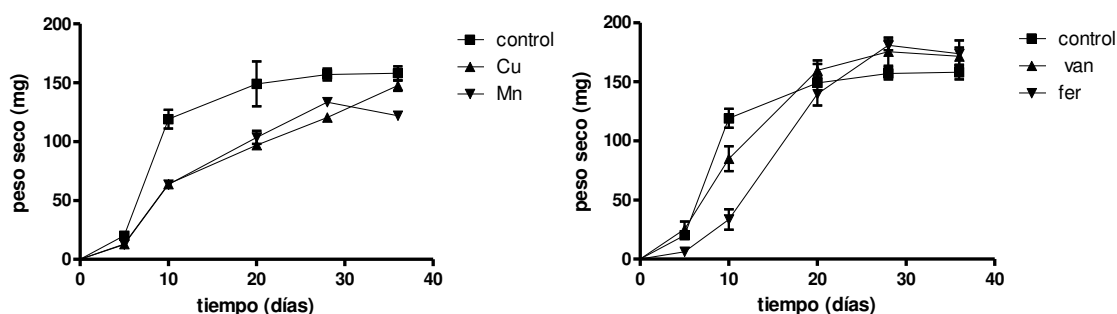


figura 3: Curvas de crecimiento de la cepa E47 en medio líquido AG adicionado con los inductores. A izquierda se muestran las curvas en presencia de metales (0,1 mM) y a la derecha en presencia de ácido vainílico (van) y ácido ferúlico (fer; 0,5 mM). Las barras representan el desvío estándar.

No se observan grandes diferencias con respecto al control a excepción de los metales pesados que muestran un efecto de toxicidad leve con respecto al control.

En todos los casos las curvas muestran una dinámica logística de crecimiento que comienza con una fase “lag” que representa la adaptación metabólica del inóculo al sustrato y que concluye alrededor del quinto día (la resolución de esta experiencia no permite estimarlo con mayor exactitud). Luego se acelera el crecimiento describiendo lo que se conoce como etapa “exponencial” con gran aumento de biomasa entre el quinto y el décimo día, haciéndose más lento a partir de ese momento para finalmente entrar en idiofase alrededor del día 20.

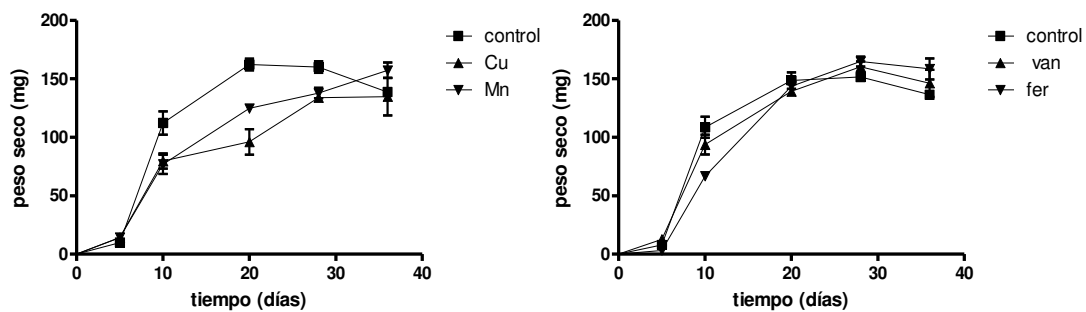
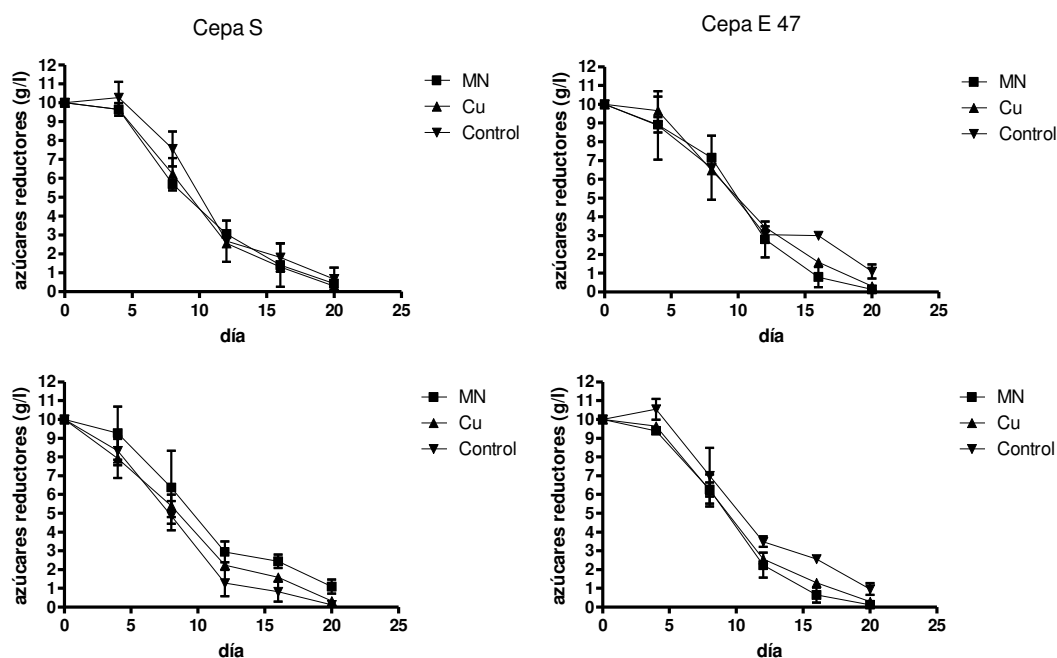


figura 4: Curvas de crecimiento de la cepa S en medio líquido AG adicionado con los inductores. A izquierda se muestran las curvas en presencia de metales (0,1 mM) y a la derecha en presencia de ácido vainílico (van) y ácido ferúlico (fer; 0,5 mM). Las barras representan el desvío estándar.

Los gráficos de crecimiento se complementan con las curvas de azúcares reductores que indican la fuente carbonada remanente en el medio. En la figura 5 se observan estas curvas en las dos cepas y con todos los inductores ensayados. No se encuentran grandes diferencias y el agotamiento de la fuente carbonada se produce en todas alrededor del día 20, lo cual confirma la entrada en el “plateau” de las curvas de peso seco.



**figura 5: Azúcares reductores en los cultivos de las cepas S y E47 adicionados con los inductores. Las barras representan el desvío estándar.**

Como siguiente paso en la caracterización del crecimiento se analizaron las curvas de producción de proteínas. Dado que el medio GG contiene ácido glutámico como fuente de nitrógeno, toda la proteína medida con el método de Bradford corresponde a la producida por el hongo. Esta proteína incluye las enzimas extracelulares entre otras. Las curvas se ven en la figura 6.

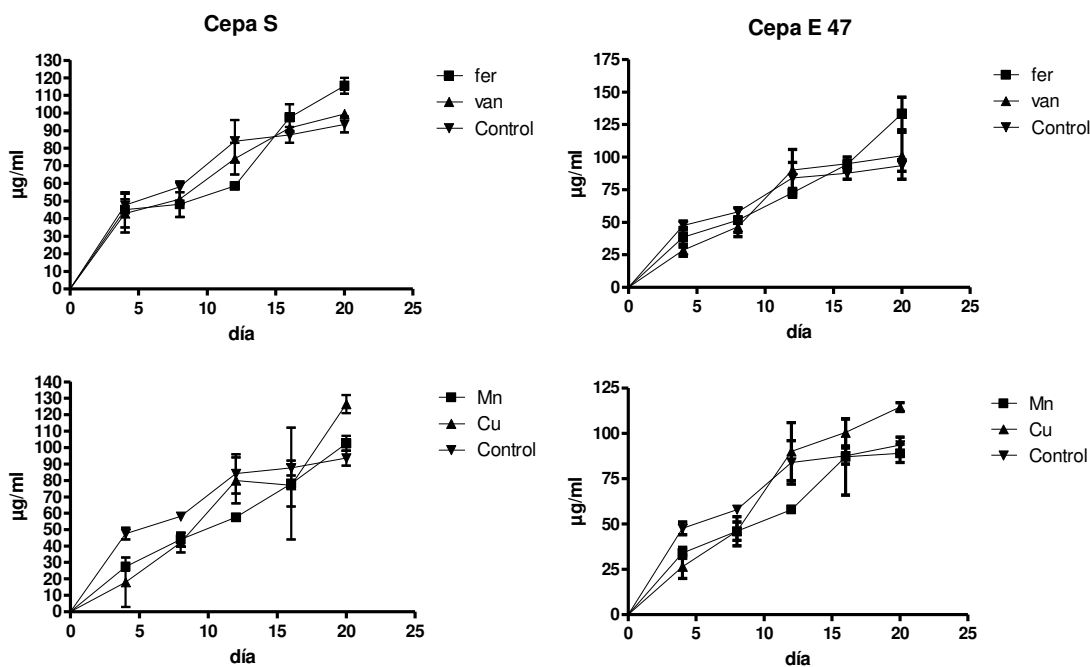


figura 6: curvas de proteínas en los cultivos de las cepas S y E47 adicionados con los inductores. Las barras representan el desvío estándar.

Se observa que la proteína total es un poco más alta en los cultivos con Cu y ácido ferúlico.

Una vez caracterizado el crecimiento de la cepa en presencia de los inductores considerados en el “screening”, se midió la actividad lacasa en los medios inducidos por metales. En la figura 7 se comparan las curvas de ambas cepas en presencia de cobre y de manganeso con los respectivos controles en medio líquido GG. En este medio se observa una inducción notable en idiofase de la cepa S en presencia de manganeso. En el caso de la cepa E47 se observa una inducción aún mayor en presencia de cobre.

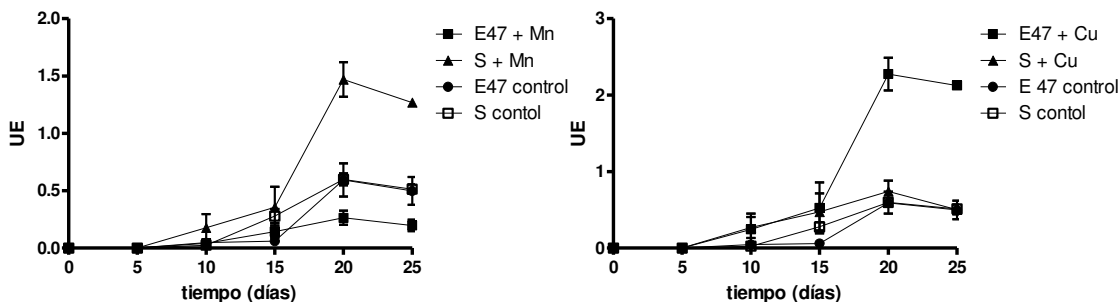


figura 7: Producción de lacasa en las cepas E47 y S en medio GG líquido adicionado con los inductores metálicos Cu y Mn. Las barras representan el desvío estándar.

La figura 8 muestra el efecto de los inductores fenólicos en medio GG también de manera comparativa. La inducción en este medio es menor, pero en todos los casos se observa que estos compuestos inducen la producción de la enzima antes de la idiofase.

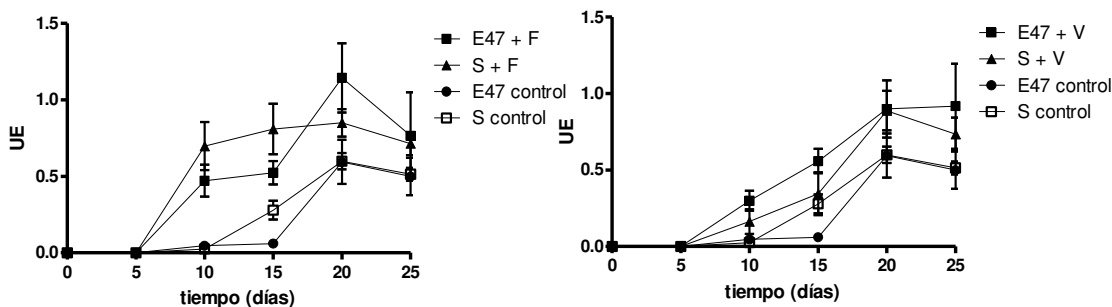
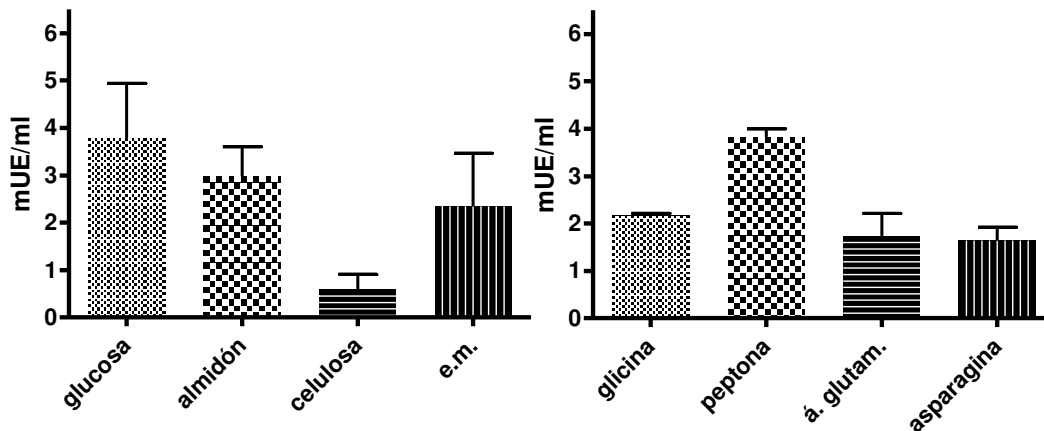


figura 8: Producción de lacasa en ambas cepas en las cepas E 47 y S en medio GG adicionado con los inductores fenólicos ácido ferúlico y ácido vainílico. Las barras representan el desvío estándar.

### 1.3.2.3 Efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Se realizaron cultivos en el medio GG con ambas cepas sustituyendo alternativamente la fuente carbonada por almidón, celulosa y extracto de malta y la fuente nitrogenada por peptona de carne, glicina y asparragina a fines de encontrar cuáles son los nutrientes que provocan en estas cepas los mayores aumentos en la producción de lacasa.



**figura 9: Dependencia de la producción de lacasa respecto a las fuentes de carbono y nitrógeno ensayadas en la cepa S. Se utilizó el medio GG indicado en materiales y métodos, sustituyendo respectivamente la fuente de estos elementos. e.m.: extracto de malta. Los desvíos estándar están representados sobre cada barra.**

Las figuras 9 y 10 muestran los resultados de este ensayo en las cepas S y E47 respectivamente. La sustitución de la glucosa como fuente de carbono no tiene un impacto positivo en la producción de lacasa, pero sí lo tiene el cambio de la fuente de nitrógeno, siendo la peptona de carne la que más altas actividades lacasa mostró.

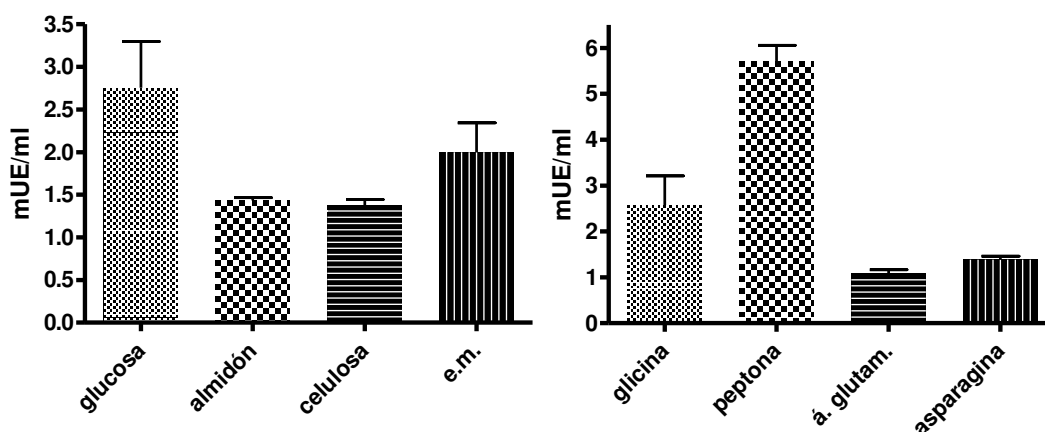


figura 10: Dependencia de la producción de lacasa de las fuentes de carbono y nitrógeno ensayadas en la cepa E 47. Se utilizó el medio GG indicado en materiales y métodos, sustituyendo respectivamente la fuente de estos elementos.

#### 1.3.2.4 Separación electroforética de las isoenzimas.

Se realizó la separación de las isoenzimas de la lacasa por electroforesis en gel de acrilamida de los sobrenadantes obtenidos en los cultivos con inductores. Los geles revelados con DMP se muestran en las figuras 11 y 12. En todos los casos se procuró sembrar 0,1 UE por calle, por lo que la intensidad de las manchas no representa la actividad en el sobrenadante.



**figura 11: SDS-PAGE de los sobrenadantes de medio líquido con inductores. pm: marcador de peso molecular; f: ácido ferúlico; v: ácido vainílico; c: control; Cu: cobre; 47: cepa E47; S: cepa S.**

Dado que no se trabajó ne condiciones de desnaturalización, las expresiones de los pesos moleculares interpoladas de los marcadores utilizados, sólo tienen valor comparativo. Se observa en ambas figuras que en los controles de las dos cepas sólo se hace visibles dos bandas. En la cepa S estas bandas tienen aproximadamente 89 y 95 kDa y en la cepa E47 86 y 99 kDa.



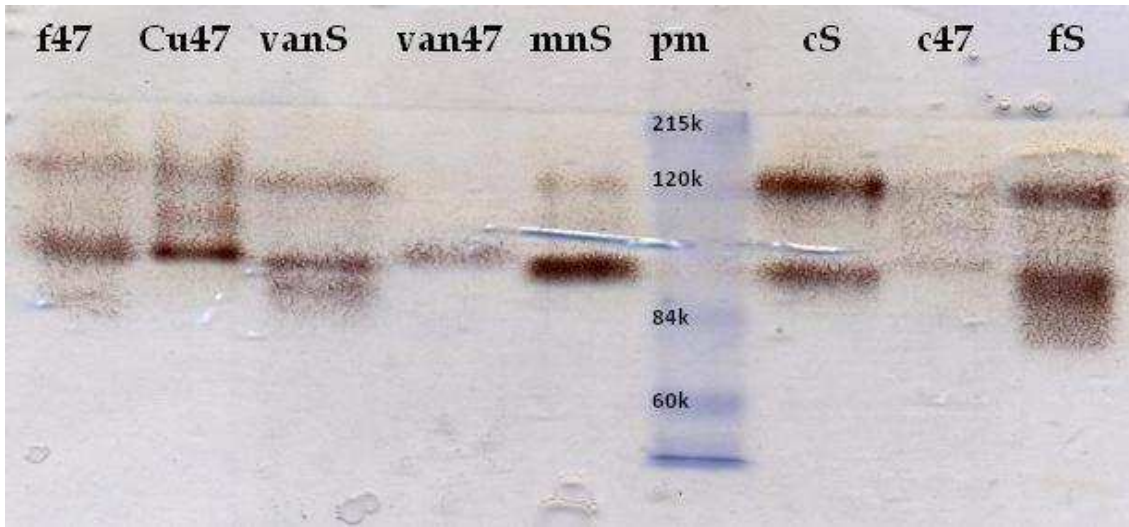


figura 12: SDS-PAGE de los sobrenadantes de medio líquido con inductores: pm: marcador de peso molecular; f: ácido ferúlico; van: ácido vainílico; c: control; Cu: cobre; mn: manganeso; 47: cepa E47; S: cepa S.

La inducción de actividad por cobre no implica la expresión de nuevas isoenzimas sino el aumento en la producción de la isoenzima más liviana de entre ambas (S=89 kDa y E47=86 kDa), ya que en el control las actividades de las dos isoenzimas son equitativas y en ambas cepas inducidas por cobre, se hace más tenue la isoenzima más pesada ya que al tomar 0.01 UE, la proporción aumentada de la otra variante la desplaza de la muestra. La inducción por manganeso parece ocurrir del mismo modo, por aumento de la actividad ligada a la variante liviana. En la calle correspondiente a la inducción por cobre sobre la cepa E47 parece que hubiera una tercera banda (en ambas figuras) entre las dos constitutivas, pero es muy tenue, por lo que no parece contribuir con mucho a la actividad total. Esta banda tendría 112 kDa pero no se ha podido aumentar su intensidad, por lo que no se la consideró en las conclusiones.

En el medio resultante de la optimización (ver siguiente apartado) las bandas S=89 kDa y E47=86 kDa se hacen tan intensas que desplazan de la muestra a las otras, parcialmente en la cepa S y casi totalmente en la cepa E47 (ver figuras 21 y 22).

En cuanto a la inducción con fenólicos se observa del mismo modo la proporción aumentada de la banda más liviana (S=89 kDa y E47=86 kDa), y además aparece una banda más liviana aún tanto en el caso del ácido ferúlico como del ácido vainillico, aunque la presencia de la banda en este último inductor es más variable. Esto ocurre en ambas cepas: banda más liviana tiene un peso relativo de 122 kDa en la cepa E47 y de 118 kDa en la cepa S.

#### ***1.3.2.5 Optimización de la producción de lacasa***

A fines de optimizar la producción de lacasa en cultivos en medio líquido, se utilizó un diseño factorial incompleto de Doehlert utilizando las concentraciones de peptona, cobre y ácido ferúlico como factores siguiendo el esquema mostrado en materiales y métodos. Se utilizó como fuente de carbono la glucosa, teniendo en cuenta lo dicho en este capítulo, a la concentración de 40 g/l siguiendo los resultados de Galhaup (30).

Se monitoreó la producción de lacasa y la concentración de azúcares reductores a lo largo de cuarenta días de cultivo obteniéndose los gráficos que se observan en las figuras 13 y 14 respectivamente para las cepas E47 y S.

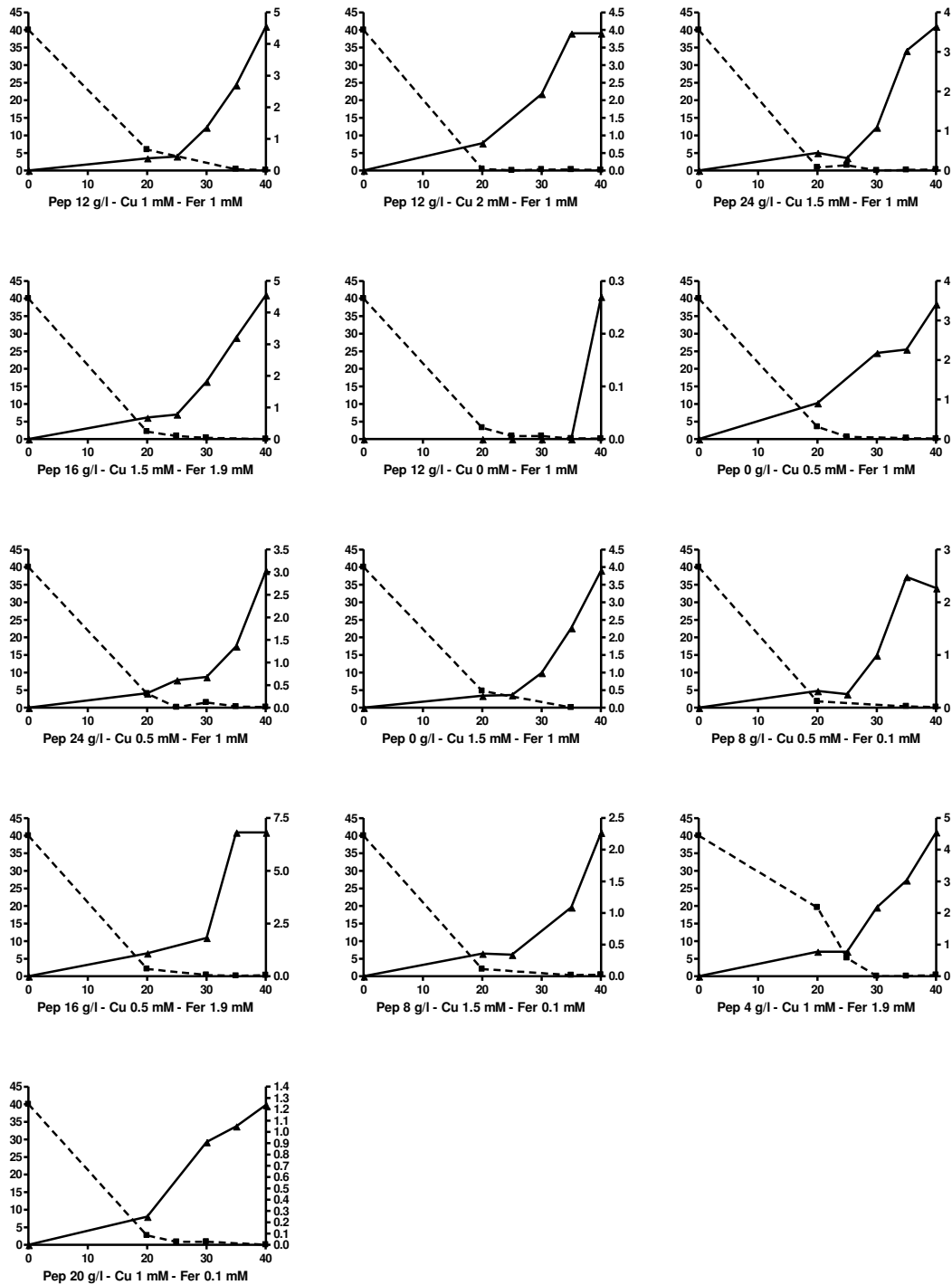
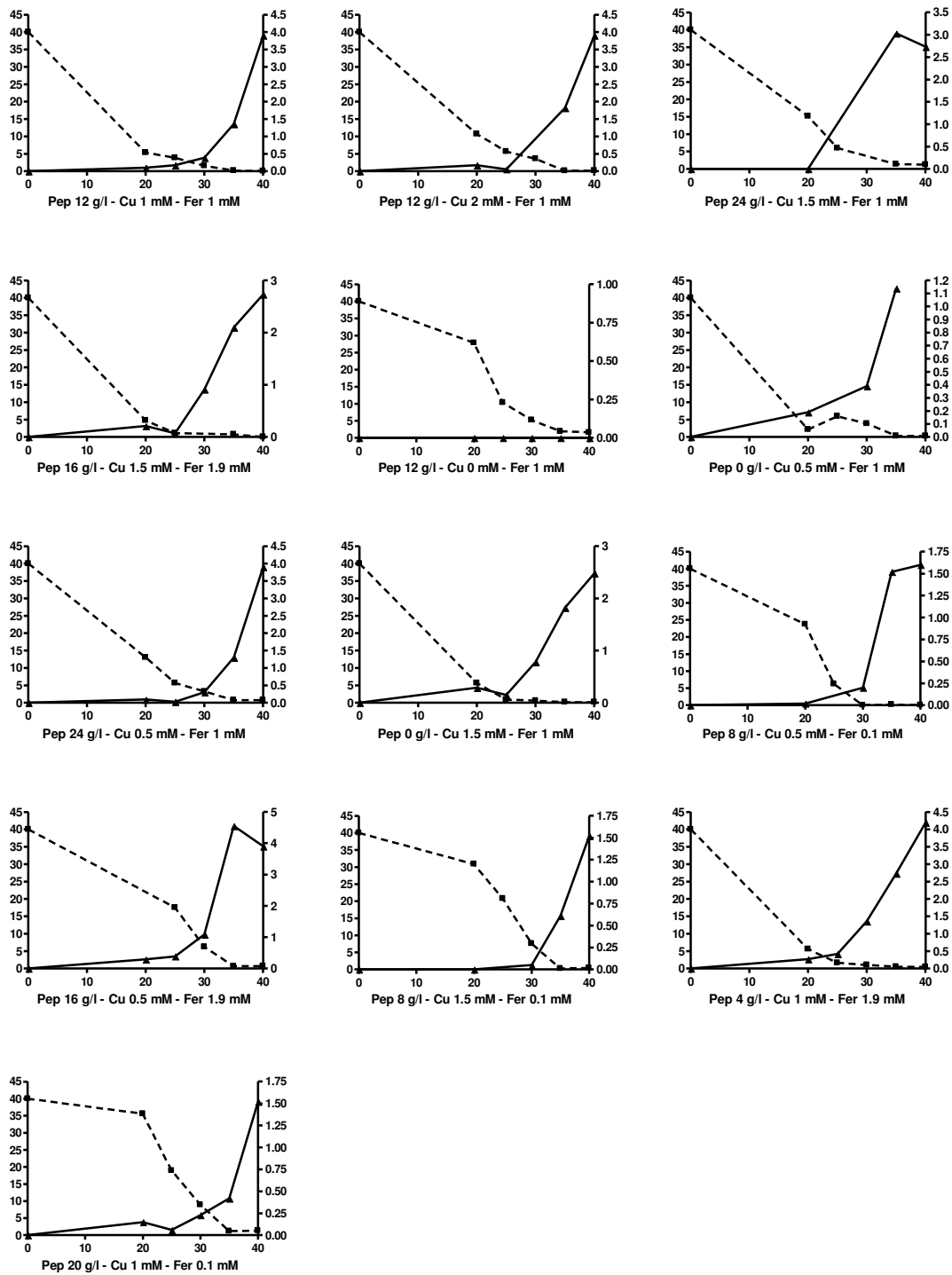


figura 13: curvas de consumo de azúcares reductores y producción de lacasa en cultivos de la cepa E 47 en medio líquido con 40 g/l de glucosa y 10 g/l de extracto de levadura. el resto de los componentes se detallan bajo cada figura. El eje de ordenadas de la izquierda indica los gramos por litro de azúcares reductores y el de la derecha las unidades enzimáticas de lacasa por ml.



**Figura 14:** curvas de consumo de azúcares reductores y producción de lacasa en cultivos de la cepa E 47 en medio líquido con 40 g/l de glucosa y 10 g/l de extracto de levadura. El resto de los componentes se detallan bajo cada figura. El eje de ordenadas de la izquierda indica los gramos por litro de azúcares reductores y el de la derecha las unidades enzimáticas de lacasa por ml.

Se observa en general que la actividad lacasa comienza a incrementarse cuando el contenido de azúcares reductores es inferior a 5 g/l. Se observa en todos los casos una dependencia de la producción de lacasa con la concentración de ácido ferúlico, pero también se observa la inexistencia de actividad lacasa en la cepa S en ausencia total de cobre y la producción tardía en esas condiciones en la cepa E47.

Se realizó el ajuste a la ecuación cuadrática que se muestra en las tablas 2 y 3 en ambos casos con un alto porcentaje de explicación de la varianza por parte de las variables. Los valores de actividad lacasa utilizados fueron los del día 40 de cultivo en las condiciones indicadas y ponderándolos con el peso seco al mismo día para obtener los valores por gramo de micelio seco.

<b>Coefficiente</b>	<b>Factor</b>
487	Cte.
8,6605	pep
38	$\text{Cu}^{2+}$
287,9867	fer
-116,5071	$\text{pep}^2$
-278,5	$(\text{Cu}^{2+})^2$
9,6676	$\text{fer}^2$
150,1155	$\text{pep} \times \text{Cu}^{2+}$
230,759	$\text{pep} \times \text{fer}$
-227,186	$\text{Cu}^{2+} \times \text{fer}$

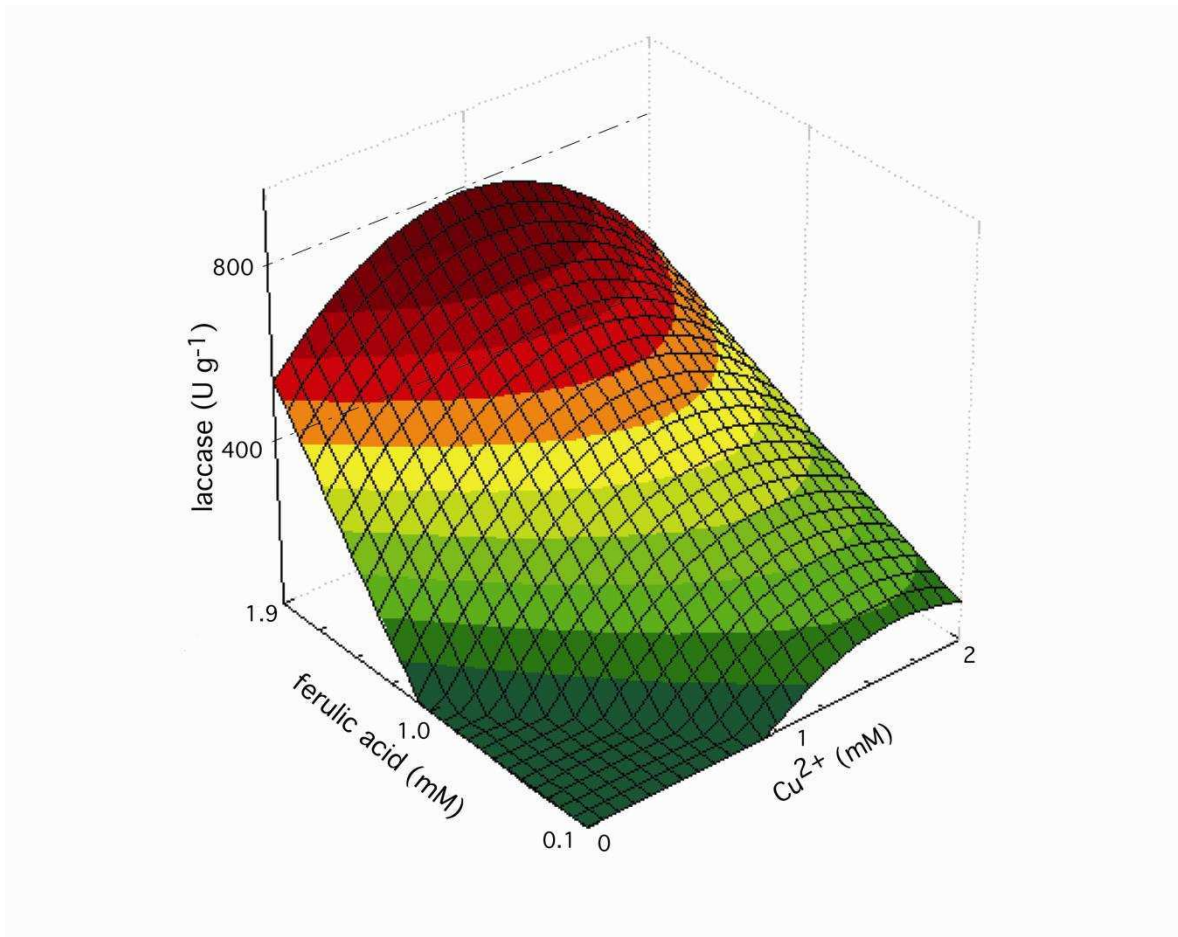
**Tabla 2: valores de los coeficientes obtenidos para cepa E47 la ecuación de optimización de actividad lacasa al día 40 de cultivo. El  $R^2$  es de 85,088 %.**

Dado que la peptona no muestra una alta influencia en la actividad lacasa se muestran en las figuras 15 y 16 los resultados de la optimización con respecto a las variables ácido ferúlico y cobre, manteniendo la peptona en su concentración más alta.

<b>Coefficiente</b>	<b>Factor</b>
325	Cte.
85,9555	pep
89,87	$\text{Cu}^{2+}$
77,78	fer
-116,84	$\text{pep}^2$
-162,5	$(\text{Cu}^{2+})^2$
-102,99	$\text{fer}^2$
-159,93	$\text{pep} \times \text{Cu}^{2+}$
-125,26	$\text{pep} \times \text{fer}$
-95,32	$\text{Cu}^{2+} \times \text{fer}$

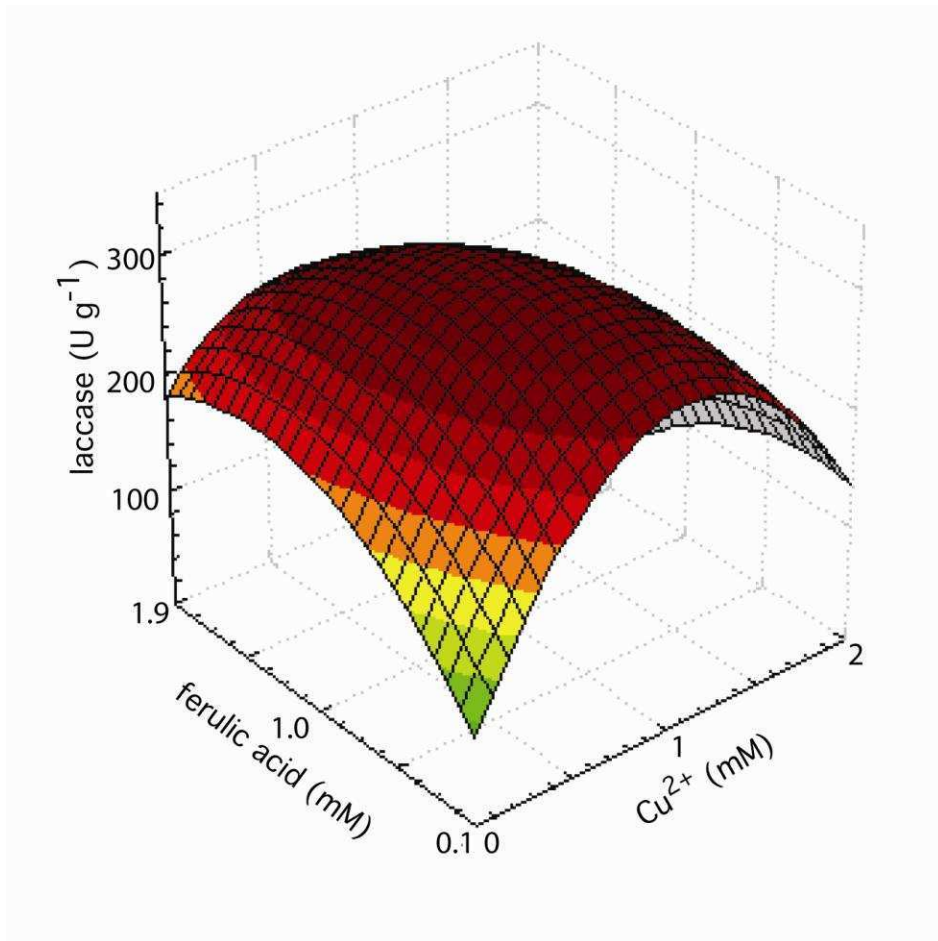
**Tabla 3: : valores de los coeficientes obtenidos para cepa E47 la ecuación de optimización de actividad lacasa al día 40 de cultivo. El  $R^2$  es de 87.103 %.**

En la figura 15 se observa una alta dependencia de la producción de lacasa con respecto al ácido ferúlico y al cobre en la cepa E47. Los valores optimizados de concentración de cobre quedaron dentro del rango del estudio entre 1 y 2 mM con una baja inducción en ausencia de ácido ferúlico. El efecto del cobre se hace más marcado en presencia de ferúlico, con un óptimo cercano a 1mM de cobre en las concentraciones más altas del aromático. No se produce lacasa en los medios con bajas concentraciones simultáneas de ambos compuestos. La concentración óptima de ácido ferúlico para la cepa E47 no puede estimarse de esta experiencia dado que los valores quedan fuera del diseño.



**Figura 15:** Actividad lacasa de la cepa E 47 al día cuarenta de cultivo calculada a partir de los parámetros obtenidos con el método factorial incompleto de Doehlert y graficado en función de las concentraciones de cobre y ácido ferúlico.

En la figura 16 se observa la dependencia de la producción de lacasa de la cepa S, cosechada al día 40, con respecto a los factores ácido ferúlico y cobre. Los óptimos para ambos factores quedaron contenidos dentro del espacio del experimento siendo tanto como para el cobre como para el ácido ferúlico de 1 mM. A diferencia de la cepa E47, la cepa S muestra una menor inducción con respecto a ambos factores y una producción no nula en ausencia de los mismos que en la cepa E47 no se observa en este medio.



**Figura 16:** Actividad lacasa de la cepa E 47 al día cuarenta de cultivo calculada a partir de los parámetros obtenidos con el método factorial incompleto de Doehlert y graficado en función de las concentraciones de cobre y ácido ferúlico.



### 1.3.2.6 Termoestabilidad

Se estudió además la termoestabilidad de las lacasas de ambas cepas en medio líquido GG de 25 días de cultivo. En las figuras 17 y 18 se observan los valores de estabilidad residual en función del tiempo a tres temperaturas (40, 50 y 60 °C) y a lo largo de 24 h para las lacasas de ambas cepas.

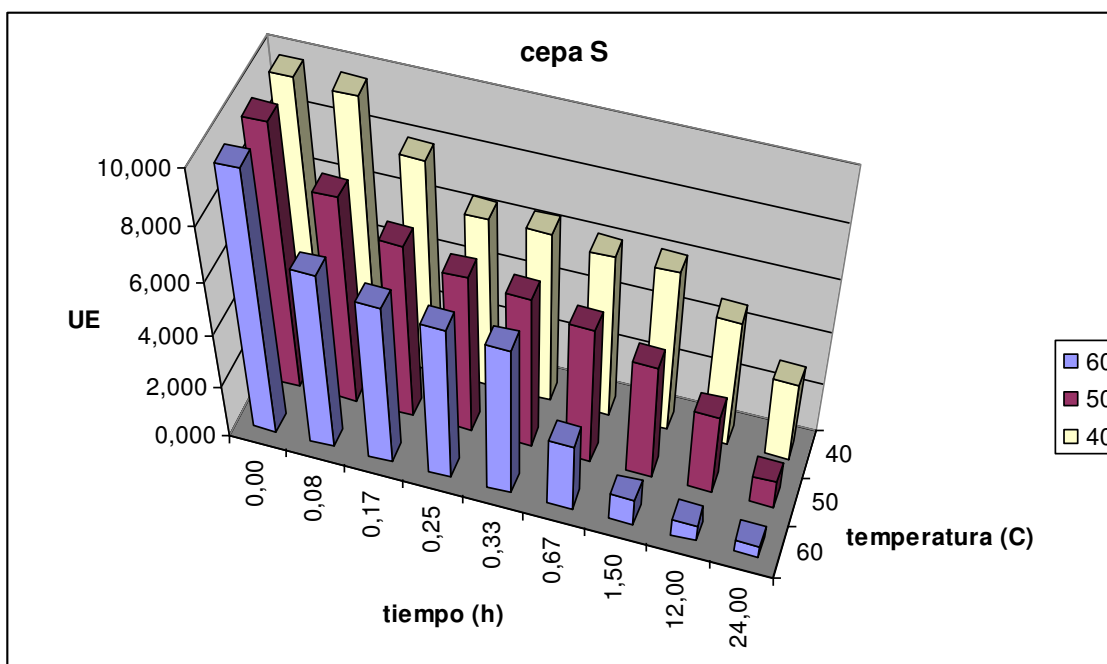


figura 17: Estabilidad térmica de la lacasa producida por la cepa E47 a 40, 50 y 60°C expresado como porcentaje de retención de la actividad inicial.

Se observa que la termoestabilidad de la lacasa de la cepa E47 es mayor que la de la cepa S.

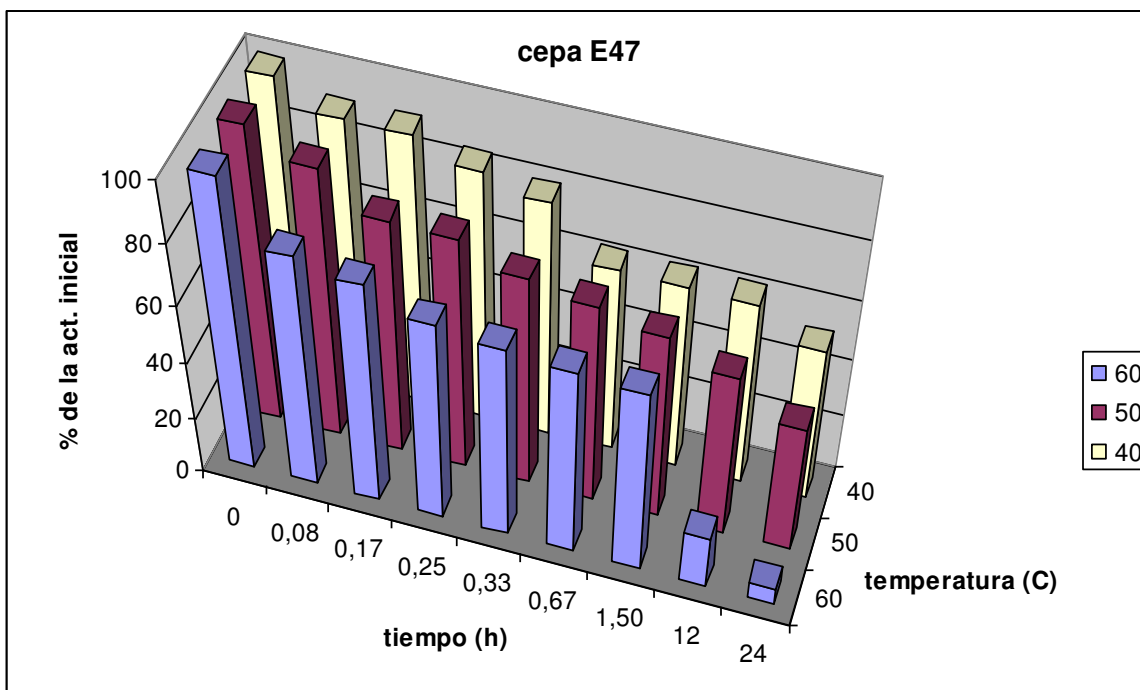
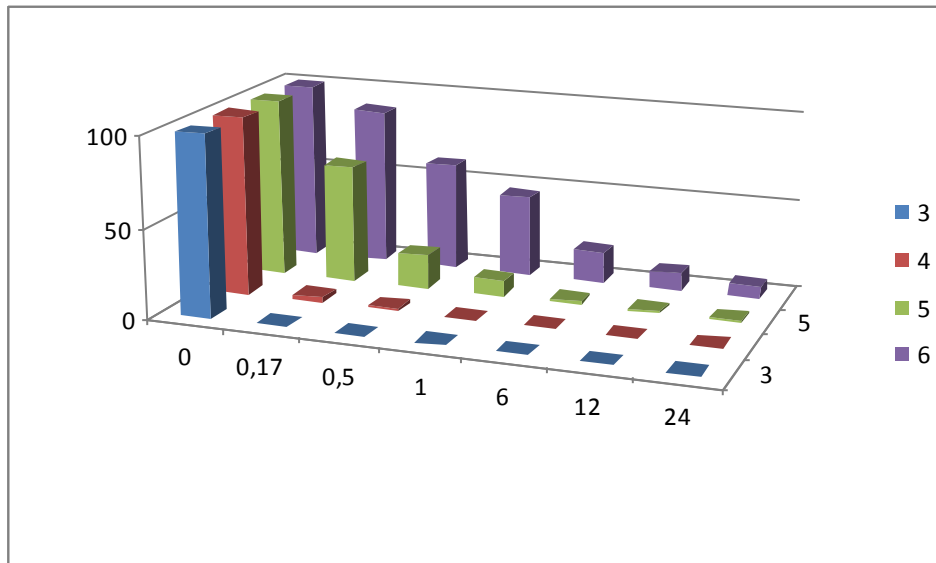


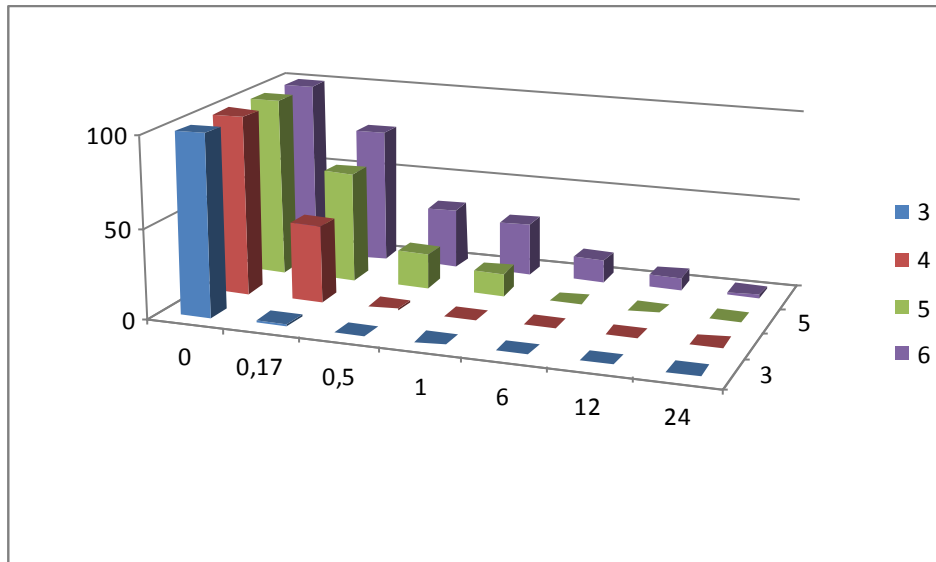
figura 18: Estabilidad térmica de la lacasa producida por la cepa E47 a 40, 50 y 60°C expresado como porcentaje de retención de la actividad inicial.

Se estudió la termoestabilidad en función del pH en sobrenadantes con buffer citrato 0,5 mM al 50% a los pH's 3, 4, 5 y 6 obteniéndose los resultados mostrados en las figuras 19 y 20 para ambas cepas.



**figura 19: Estabilidad térmica a 70°C de la lacasa producida por la cepa S a pH 3, 4, 5 y 6 expresado como porcentaje de retención de la actividad inicial. El tiempo se expresó en horas.**

La estabilidad fue menor en medios con buffer que en los sobrenadantes puros y se observa que a pH's altos las lacasas de estas cepas son mucho más estables que a pH's ácidos.



**figura 20: Estabilidad térmica a 70°C de la lacasa producida por la cepa E47 a pH 3, 4, 5 y 6 expresado como porcentaje de retención de la actividad inicial. El tiempo se expresa en horas.**

No hubo un buen ajuste a modelos de estabilidad térmica, probablemente debido a la presencia de isoenzimas de distinta vida media, como lo evidencian las separaciones electroforéticas a continuación. La vida media fue interpolada calculada empíricamente con mediciones repetidas e interpolando gráficamente el valor en minutos que se indica en la figura 21.

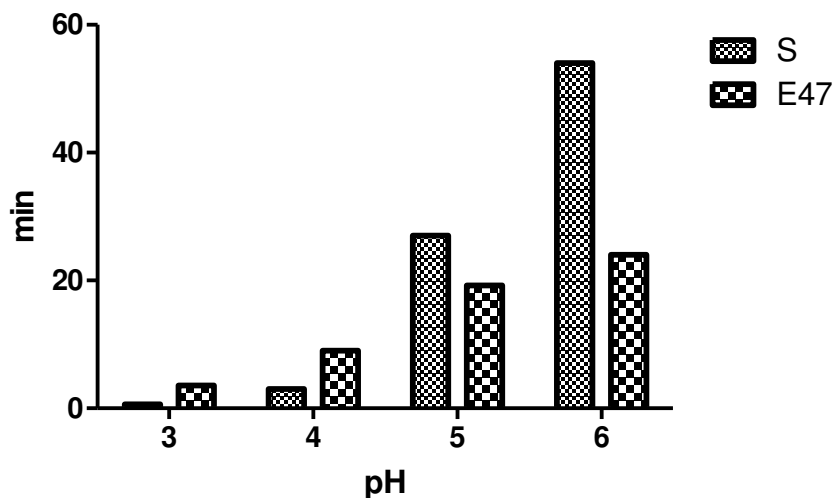


figura 21: Termoestabilidad a 70 C en minutos a distintos pH de las lacasas producidas por ambas cepas de *G. lucidum*.

Para evaluar la termoestabilidad de las distintas isoenzimas se realizaron electroforesis de sobrenadantes procedentes de cultivos enriquecidos con cobre que se muestran en las figuras 21 y 22 que indican que las bandas de 99 kDa (cepa E47) y 95 (cepa S) serían más estables que las bandas pesadas de ambas cepas.

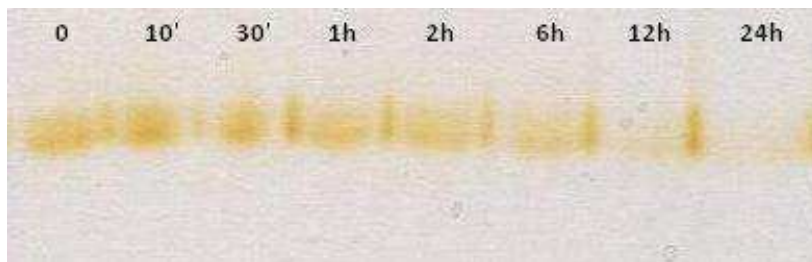
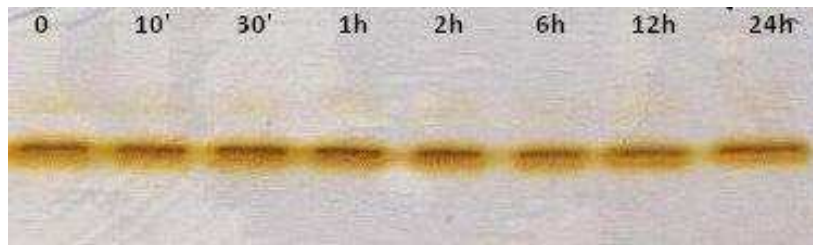
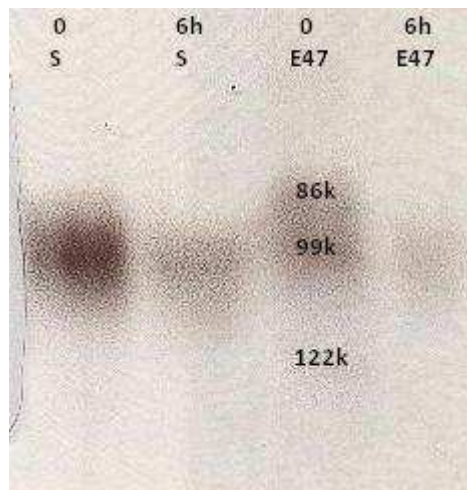


figura 22: Separación electroforética de las bandas de lacasa en cultivos de la cepa S utilizando cobre como inductor y exponiendo el sobrenadante a tratamiento térmico a 60°C durante el tiempo expresado en cada calle.



**figura 23:** Separación electroforética de las bandas de lacasa en cultivos de la cepa E 47 utilizando cobre como inductor y exponiendo el sobrenadante a tratamiento térmico a 60°C durante el tiempo expresado en cada calle.

La banda correspondiente a la inducción con aromáticos se evaluó por electroforesis de un sobrenadante de cultivos en presencia de ácido ferúlico (figura 23) donde se observa que la banda más liviana y la más pesada de la cepa E47 ( 86 y 122 kDa) son más inestables, como en las figuras 21 y 22, que la banda intermedia (99 kDa).



**figura 24:** Separación electroforética de las bandas de lacasa en cultivos de las cepas E47 y S utilizando ácido ferúlico como inductor y exponiendo el sobrenadante a tratamiento térmico a 60°C durante el tiempo expresado en cada calle.

### 1.3.2.7 Actividad lacasa frente a distintos sustratos

La actividad lacasa fue testada a distintos pH's sobre los sustratos clásicos de la enzima lacasa, ABTS, DMP, guayacol y siringaldazina.

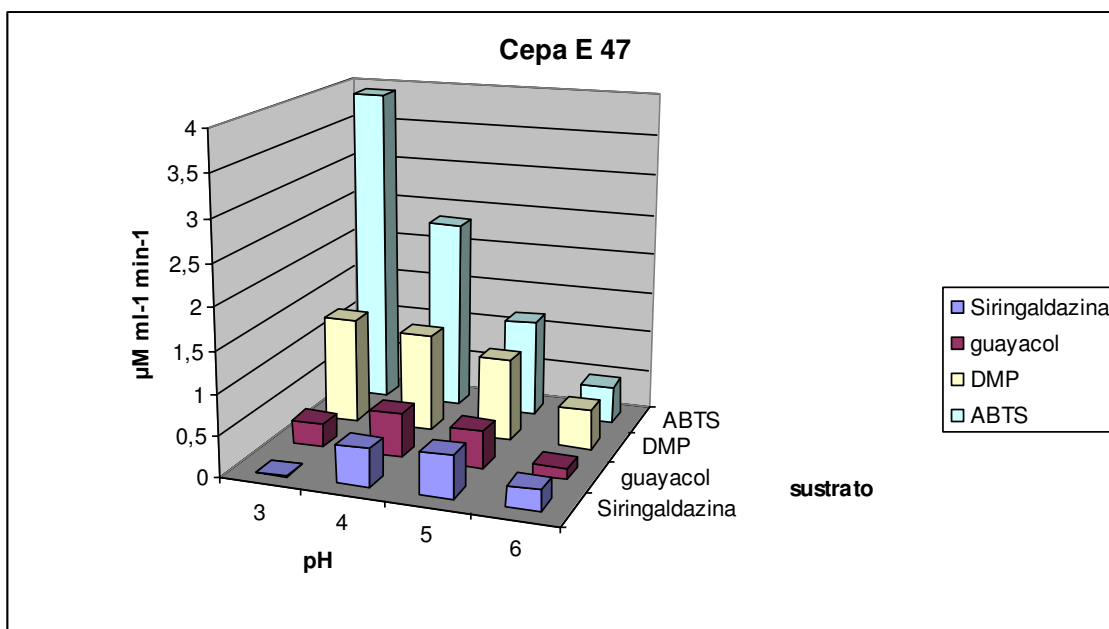


figura 25: Actividad de la enzima lacasa en diferentes sustratos a distintos pHs en la cepa E47

las figuras 25 y 26 muestran los resultados de esta experiencia. Si bien los pH's óptimos para la lacasa se sitúan en el rango de 3-4, existen notables diferencias frente a distintos sustratos, es notable por ejemplo la mayor dependencia del ABTS del pH con respecto a los demás sustratos clásicos de esta enzima. Las bajas actividades mostradas por el guayacol coinciden con el hecho de que no pudo revelarse actividad en geles electroforético con este sustrato.

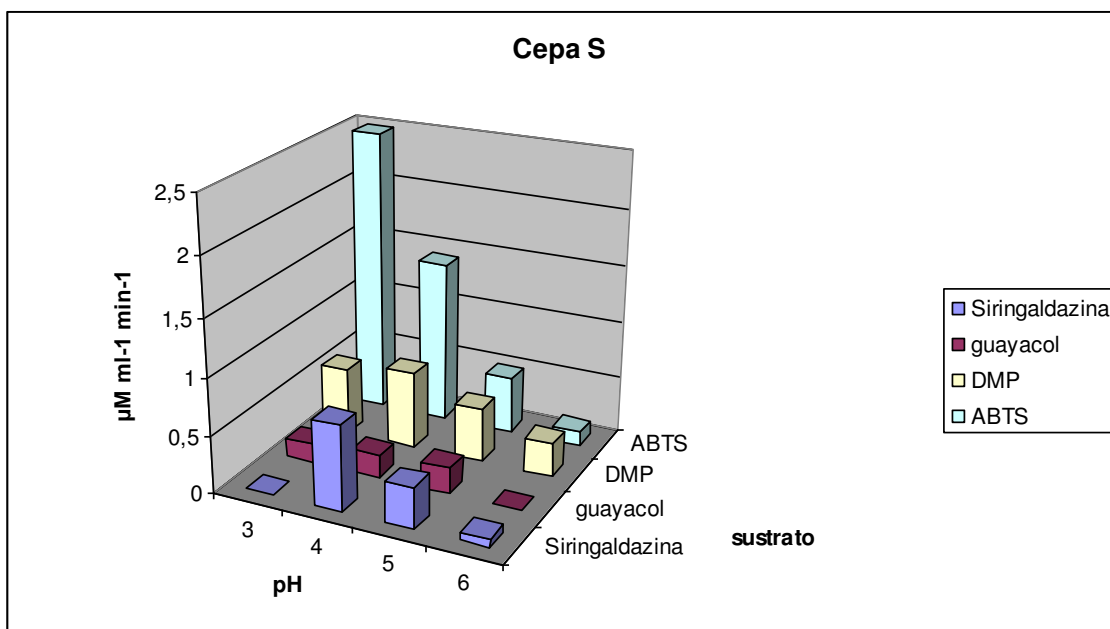


figura 26: Actividad de la enzima lacasa en diferentes sustratos a distintos pHs en la cepa S



### 1.3.2.8 Dinámica de Michaelis – Menten aparente

Dado que el sobrenadante producido por la optimización de la producción de lacasa por la cepa E47 produjo una cantidad mucho mayor de la isoenzima de 99 kDa, se pudo evaluar la dinámica de Michaelis Menten de este sobrenadante frente a los sustratos DMP y ABTS a distintos pH's considerando que las actividades de las otras isoenzimas son despreciables. Las gráficas de velocidad frente a concentración de ambos sustratos se muestran en la figura 27.

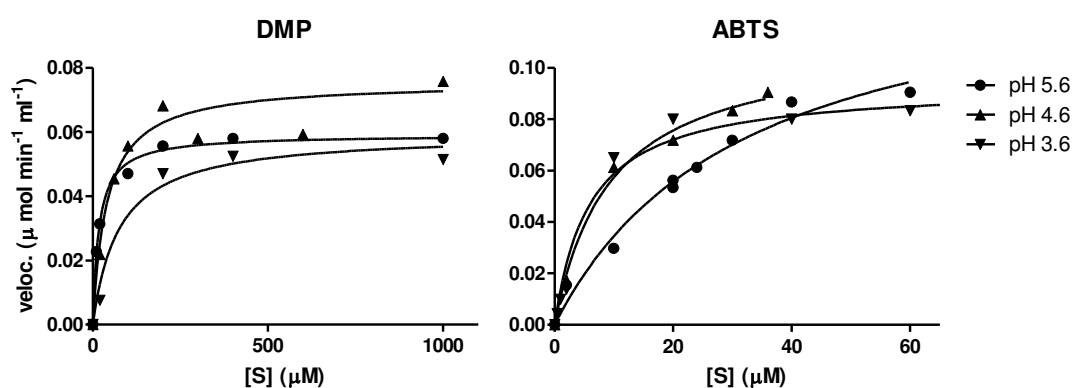


figura 27: curvas de velocidad de la enzima lacasa a distintos pHs para la cepa E47 con respecto a los sustratos DMP y ABTS.

Las Km aparentes se muestran en la tabla 3 a distintos pH en buffer acetato sobre los sustratos DMP y ABTS. Estos valores no son comparables con datos bibliográficos ya que se trata de un sobrenadante de cultivo y no de una enzima purificada.

	DMP	ABTS
pH 5,6	17,6	6,844
pH 4,6	40,51	1,727
pH 3,6	75,75	1,414

Tabla 4: Km en  $\mu\text{M}$  de la enzima lacasa a distintos pHs para la cepa E47 con respecto a los sustratos DMP y ABTS.

## 1.4 Discusión

La producción de peroxidasas no se pudo verificar, lo cual concuerda con la mayoría de la bibliografía (31, 34, 37, 42, 43) para varias especies del género *Ganoderma* en la que se indica que no es un buen productor de las mismas. Si bien los ensayos de decoloración de azure B (ver capítulo 2) sugieren que habría actividad LiP, se conoce en la actualidad esta decoloración puede deberse a la actividad lacasa (44) por haberse podido llevar a cabo con la enzima purificada.

La producción de lacasa se vio inducida por iones metálicos como se refieren numerosos trabajos sobre otros géneros (8, 45-47) aunque la información en *G. lucidum* es escasa. Lo mismo ocurre en la literatura con respecto a los inductores de naturaleza fenólica, emparentados con los productos de degradación de la lignina: muchas citas refieren la inducción en otros hongos de pudrición blanca (48-50), pero son escasas las referencias al género *Ganoderma* (35).

Con respecto a la baja o nula actividad lacasa alcanzada por los medios de cultivo sin inductores, se concluye que la importancia de estos es primordial para alcanzar niveles eficientes de producción de la enzima.

Las variantes isoenzimáticas encontradas en ambas cepas son tres en nuestro trabajo, que es el número encontrado por Ko et al. (32) aunque en algunas separaciones electroforéticas aparece una banda adicional de expresión tenue y errática. La importancia de estas variantes por su posible aplicación industrial es relativa ya que en los cultivos en condiciones óptimas de producción de lacasa, la variable intermedia (S= 95 kDa y F47= 99 kDa) supera con mucho la actividad de las variables livianas (S= 89 kDa y F47= 86 kDa) y pesadas (S= 112 kDa y F47= 118 kDa) de ambas cepas.

La termoestabilidad de las lacasas producidas en los medios de cultivo ensayados son mayores que las que se citan en la literatura. Baldrian e.g.(1) indica que las lacasas de *G. lucidum* se inactivan a 60°C.

La estabilidad térmica a distintos pH's muestra un comportamiento inverso a la mayoría de las citadas en la bibliografía sobre hongos de la pudrición blanca (23)

donde se indica una mayor estabilidad a pH's bajos, pero también se reseñan excepciones a esta regla (24) en las cuales encuadrarían nuestros resultados.

## Referencias

1. P. Baldrian, *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 215 (2006).
2. J. M. Harkin, M. J. Larsen, J. R. Obst, *Mycologia*. **66**, 469 (1974).
3. C. F. Thurston, *Microbiology* **140**, 19 (1994).
4. A. Hatakka, *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 125 (1994).
5. C. Eggert, U. Temp, K. E. Eriksson, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1151 (1996).
6. P. Giardina *et al.*, *Biochem. J.* **341 ( Pt 3)**, 655 (1999).
7. G. Palmieri *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**, 31301 (1997).
8. G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella, G. Sannia, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 920 (2000).
9. S. Garavaglia *et al.*, *J. Mol. Biol.* **342**, 1519 (2004).
10. P. Giardina *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1293 (2007).
11. G. Palmieri *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2754 (2001).
12. S. Chen, D. Ma, W. Ge, J. A. Buswell, *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 143 (2003).
13. S. Chen, W. Ge, J. A. Buswell, *Eur. J. Biochem.* **271**, 318 (2004).
14. S. Chen, W. Ge, J. A. Buswell, *FEMS Microbiol. Lett.* **230**, 171 (2004).
15. A. J. Augustine *et al.*, *Biochemistry* **47**, 2036 (2008).
16. C. H. Kjaergaard *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 5548 (2012).
17. T. E. Machonkin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5507 (2001).
18. A. Messerschmidt, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **187**, 341 (1990).
19. A. Leontievsky, N. Myasoedova, N. Pozdnyakova, L. Golovleva, *FEBS Lett.* **413**, 446 (1997).
20. A. A. Leontievsky *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 9 (1997).
21. M. T. Cambria, M. D. Di, M. Falconi, S. Garavaglia, A. Cambria, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **27**, 501 (2010).

22. S. V. Shleev *et al.*, *Biochimie* **86**, 693 (2004).
23. J. M. Bollag, A. Leonowicz, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 849 (1984).
24. P. Baldrian, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 560 (2004).
25. P. Baldrian, *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215 (2006).
26. L. L. Kiiskinen, L. Viikari, K. Kruus, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 198 (2002).
27. J. +ánajdr *et al.*, *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**, 291 (2011).
28. P. Baldrian, J. Gabriel, *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 235 (2003).
29. P. Baldrian, *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 78 (2003).
30. C. Galhaup, D. Haltrich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 225 (2001).
31. T. M. D'Souza, C. S. Merritt, C. A. Reddy, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5307 (1999).
32. E. M. Ko, Y. E. Leem, H. T. Choi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 98 (2001).
33. A. J. Matos, R. M. Bezerra, A. A. Dias, *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 270 (2007).
34. R. T. Mendonca, J. F. Jara, V. Gonzalez, J. P. Elissetche, J. Freer, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1323 (2008).
35. K. Murugesan, I. H. Yang, Y. M. Kim, J. R. Jeon, Y. S. Chang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 341 (2009).
36. P. Li, H. Wang, G. Liu, X. Li, J. Yao, *Enzyme Microb. Technol.* **48**, 1 (2011).
37. V. Elisashvili, E. Kachlishvili, T. Khardziani, S. N. Agathos, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 1091 (2010).
38. J. Hess *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98-100**, 229 (2002).
39. M. A. Galvagno, *Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica* **17**, (1976).
40. F. S. Archibald, *Applied and environmental microbiology* **58**, 3110 (1992).
41. A. Paszczynski, V. B. Huynh, R. Crawford, *FEMS Microbiology Letters* **29**, 37 (1985).
42. J. Simonic, J. Vukojevic, M. Stajic, J. Glamoclija, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 408 (2010).

43. G. Songulashvili, V. Elisashvili, S. Wasser, E. Nevo, Y. Hadar, *Biotechnol. Lett.* **28**, 1425 (2006).
44. E. Grassi, P. Scodeller, N. Filiel, R. Carballo, L. Levin, *International Biodeterioration & Biodegradation* **65**, 635 (2011).
45. O. V. Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28 ( Pt 1)**, 47 (1998).
46. M. Lorenzo, D. Moldes, M. A. Sanroman, *Chemosphere* **63**, 912 (2006).
47. B. Schilling, R. M. Linden, U. Kupper, K. Lerch, *Curr. Genet.* **22**, 197 (1992).
48. M. T. Cambria, S. Ragusa, V. Calabrese, A. Cambria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **163**, 415 (2011).
49. A. M. Farnet, A. C. Chevremont, G. Gil, S. Gastaldi, E. Ferre, *Chemosphere* **82**, 284 (2011).
50. A. Leonowicz, J. Trojanowski, B. Orlicz, *Acta Biochim. Pol.* **25**, 369 (1978).

## Capítulo 2: Producción de fructificaciones en medio sólido

### 2.1 Introducción

La utilización de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* con fines medicinales está documentada desde hace al menos 2000 años en china. Por su relativa rareza, en el medio natural, su utilización se vio siempre limitada a esta escasa disponibilidad ya que el cultivo se pudo realizar de manera eficiente después de 1970. Durante la década siguiente, esta práctica creció enormemente, sobre todo en China, para abastecer al comercio y a las diversas industrias farmacéuticas tradicionales que preparan extractos y productos adicionados con ellos. A pesar de tratarse de un cultivo que utiliza sustratos deshecho de muchas actividades humanas, su cultivo es más complejo que el de otras especies de hongos comerciales. Una de las dificultades reside en que la formación del cuerpo fructífero es mucho más lenta que en otros hongos cultivables y requiere condiciones estables para que el crecimiento no se detenga de manera definitiva por ejemplo, la desecación momentánea de la superficie en crecimiento en cualquier estadio (cita) interrumpe el aumento de biomasa de la fructificación. La temperatura también es crítica, ya que sólo por encima de los 21°C es posible obtener las fructificaciones. Otra dificultad surge de la complejidad filogenética y la enorme variabilidad morfológica que se esconde bajo este complejo de especies (1), y que hace que los protocolos de cultivo calibrados para una cepa, no sean extensibles a otras. A pesar de que el cultivo se ha extendido a gran escala, la literatura científica no abunda en detalles sobre el proceso de fructificación. Gonzales Matute et al. (2) han puesto a punto el cultivo de una de estas cepas utilizando como sustrato la cascarilla de girasol, deshecho de la industria oleaginosa en nuestro país. Existen además textos clásicos que describen métodos de cultivo (3, 4), aunque su aplicación se encuentra con las dificultades concernientes a los diversos requerimientos de cada cepa en particular.

Para la puesta a punto de una técnica de cultivo es necesario conocer los parámetros de crecimiento en el medio en cuestión. Esta estimación se ha llevado a cabo tradicionalmente midiendo la pérdida de peso seco del sustrato como medida de la respiración total del hongo y reflejo de su actividad metabólica ligada al crecimiento. La cuantificación de quitina (5) ofrece la posibilidad de evaluar el crecimiento de una manera más directa debido a que refleja la cantidad de micelio presente en la muestra y por eso se la ha utilizado desde hace más de dos décadas (5-8)

La producción de enzimas ligninolíticas y lignocelulolíticas también está relacionada con el aprovechamiento de cada sustrato (9-12) y su conocimiento no sólo es útil por su aporte al cultivo de hongos, sino también (y principalmente) por todas las aplicaciones biotecnológicas que en la actualidad requieren de estas enzimas.

Finalmente la capacidad de un hongo para degradar chips de madera supone una gran posibilidad de reaprovechamiento de residuos de establecimientos forestales que en nuestro país constituyen un volumen considerable. (13)

En el presente capítulo se exponen los resultados de la puesta a punto del cultivo de nuestra cepa E47 sobre residuos de la industria maderera local, producto de la explotación del pino y el álamo, y la evaluación del rendimiento en peso seco y producción de polisacáridos hidrosolubles, que son los extractivos ligados a muchas de las propiedades terapéuticas de *Ganoderma*. Seguimos en parte el método propuesto por Stamets (2003) con madera de aliso y roble, evaluando los requerimientos para obtener fructificaciones con nuestra cepa en las maderas de la industria local.



## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Inóculo inicial**

Se utilizaron cuadrados de agar de aproximadamente 1 cm de lado provenientes de cultivos en caja de petri de una semana de crecimiento en medio agar-malta.

### **2.2.2 Semilla (inóculo)**

Se preparó con granos enteros de avena previamente hervidos durante una hora en exceso de agua, se los esterilizó en frascos Erlenmeyer de 1 litro cerrados con tapón de algodón durante una hora a 120 C en autoclave. Una vez enfriado, se inoculó con un taco de los cultivos en agar-malta y se agitó tapado. La agitación se repitió todos los días a fines de evitar la formación de una masa sólida. El inóculo se mantuvo a 24 C en oscuridad hasta la completa invasión del hongo y luego se lo mantuvo en heladera a 4 C hasta el momento del uso.

### **2.2.3 Medio (sustrato) sólido**

Se utilizó aserrín de pino (*Pinus radiata* D. Don) y álamo (*Populus nigra* L.)

Se hidrató hasta el 80% sin previo hervor en frascos Erlenmeyer de dos litros y se esterilizó durante dos horas en autoclave a 120 C cerrados con tapón de algodón. El enriquecimiento con cobre se realizó reemplazando el agua con una solución 10 mM de CuSO<sub>4</sub> antes del autoclavado.

Los chips ambas maderas de aproximadamente 1 g cada uno fueron cortados de manera que tuvieran condiciones uniformes para posteriores análisis microscópicos o gravimétricos (aproximadamente 0.5 x 1 x 3 cm). Se hirvieron

durante una hora en exceso de agua y luego de escurrirlos se los autoclavó en bolsas de polipropileno durante una hora a 120 C en autoclave. La mezcla con el aserrín se realizó en el momento de la inoculación.

#### ***2.2.4 Inoculación***

Se vació el aserrín frío en bateas de plástico esterilizadas con alcohol etílico 70 % y se agregó la semilla mezclándolos manualmente en condiciones lo más asépticas posibles. En los medios con chips de madera, éstos se agregaron estériles en la batea antes de mezclar con la semilla. El medio así inoculado se repartió en bolsas calculando 300 g de materia seca en cada una. La apertura de las bolsas se limitó con una sección de tubo plástico de aproximadamente 5 cm de diámetro por 5 de longitud rodeando el extremo libre de la bolsa. El agujero se obturó con un tapón de algodón y gasa. Ninguno de estos materiales fue esterilizado.

#### ***2.2.5 Mantenimiento de los cultivos***

La incubación se realizó a 24 C en oscuridad para el crecimiento vegetativo y a 28 C bajo dos condiciones de luminosidad para la fructificación. Luego de la completa colonización del sustrato se transfirieron las bolsas a una cámara húmeda con las siguientes condiciones:

Iluminación: la fructificación se ensayó con dos intensidades de luz: Baja ( $50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y alta ( $350 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) provistas por una lámpara de incandescencia. 'p

Riego: Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara húmeda desde la apertura de la bolsa. La provisión de humedad extra se evaluó con riego por aspersión manual hasta el chorreado de las bolsas y por inmersión constante de las bolsas (cortadas también en la parte inferior) en agua hasta 5 – 6 cm de su altura. Se mantuvieron como control bolsas sin más agregado de humedad que el contenido inicial del medio. En todos los casos se vaporizó periódicamente la cámara para mantener la humedad del aire.

Aireado: Durante la colonización del sustrato, las bolsas no tuvieron más aireación que la del tapón de algodón, además del oxígeno que difunde por el polipropileno. Luego de abrirse, la cámara húmeda se mantuvo descubierta durante las horas de iluminación, y luego cubierta con un plástico oscuro con agujeros que permitieran el paso de oxígeno.

### ***2.2.6 Cosecha y conservación de las fructificaciones***

Se cortaron las fructificaciones maduras y se conservaron según su utilización posterior en freezer (-20C) o secadas en estufa a 30 C, pesadas y trituradas en un molino de Bult para otros análisis. La producción fue calculada como eficiencia biológica (peso seco de la oleada dividido por el peso seco del medio se cultivo)

### ***2.2.7 Determinación de composición y extractivos***

La detreminación de componentes por su solubilidad se realizó suspendiendo 100 g del material triturado en agua fría, agua caliente y NaOH 1M, durante una hora (dos veces en cada uno) y separándose del sobrenadante por centrifugado a 20000 rpm durante 10 min. El contenido de hidratos de carbono en cada una de

las fracciones, incluido el precipitado final insoluble resuspendido se cuantificó por el método del fenol sulfúrico:

Se suspendió la muestra en 0.5 ml de agua destilada + 0.5 ml fenol 5%, se agitó y se agregaron 2.5 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado. Se agitó nuevamente y se dejó enfriar una hora. Se leyó la absorbancia a 490 nm. La curva patrón se realizó con glucosa. Cuando fue necesario se diluyó con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado.

El análisis de quitina se llevó a cabo estimado el contenido de quitina (N-acetilglucosamina) hidrolizando las muestras. Cada muestra se secó y se molió en mortero. La hidrólisis se efectuó con la muestra seca + HCl 6N a 100 °C (100 mg de muestra y 3 ml de HCl) por 4 horas y luego centrifugando y conservando los sobrenadantes. La alcalinización se realizó sobre 0.5 ml del sobrenadante del centrifugado + 1.5 ml NaOH 3N + 1.5 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 M (2.78 g/100 ml llegando a pH final aproximado 8).

Se inició la reacción agregando a 0.5 ml del hidrolizado alcalinizado el 0.5 ml Reactivo A (acetilacetona 1 ml + 50 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.25 M) e incubando 20 minutos a 100°C. Luego de enfriar a temperatura ambiente se agregaron a los tubos de reacción 3 ml de etanol absoluto agitando en vortex. Se agregó a los tubos de reacción 0.5 ml del reactivo B (p-dimetilamino benzaldehído 2.67 g en 100 ml de: HCl (conc.) + etanol (1:1)) e incubando 10 minutos a 65°C.

Se leyó absorbancia a 530 nm. Como curva patrón se utilizó una solución de glucosamina 1 mg/ml haciendo la reacción con 10 a 80  $\mu\text{l}$  de solución patrón. El factor es la inversa de la pendiente abs vs  $\mu\text{g}$  de glucosamina.

### **2.2.8 Ensayos de enzimas**

Los extractos se prepararon triturando los medios gastados y los cuerpos fructíferos con un molinillo eléctrico durante 5 segundos, suspendiéndolos en agua

(1 en 5) y agitando en vortex durante 10 min. Luego se los centrifugó a 15000 RPM durante 10 min y se conservaron los sobrenadantes.

Los ensayos cualitativos de enzimas hidrolíticas se realizaron de la siguiente manera: se utilizó un gel de agarosa 1.7% y Buffer acetato pH 4.8 0,05M adicionado con CMC 0.1% (para celulasas) xilano 0.1% (para xilanasas) pectina de manzana 0.1% (para pectinansas) o almidón 0.1% para amilasas, agar 1.7 %, CMC 0.1 %. Se esterilizó en autoclave a 120 C 20 min. Se vertieron 20 ml por caja de Petri y se realizaron perforaciones con sacabocado de calibre 5 mm. Se sembraron 50 µl de extracto de medio sólido de 30 días y se incubó a 50 C durante una hora. Se reveló con el colorante azóico rojo congo (0.5 %) durante 5 minutos para las xilanasas, celulasas y pectinasas y con lugol para amilasas. Se lavó con solución de NaCl 1M y se fotografiaron los geles.

Ensayos cuantitativos: se realizó la reacción con el sustrato específico y luego se procede a medir azúcares reductores mediante la reacción de Somogyi-Nelson. Se hicieron blancos de sustrato (sustrato + buffer) y blancos de sobrenadante (sobrenadante + buffer), además del blanco de reactivos (reacción de Somogyi Nelson sobre agua para calibrar el espectrofotómetro) El valor que se utilizó para los cálculos es: absorbancia (reacción) - abs. bl.sobrenadante - abs. bl. Sustrato.

La curva patrón se hizo con el azúcar que fuera liberado por la reacción (glucosa, xilosa, ácido galacturónico).

La actividad enzimática se expresó como µmol de producto / min . ml.

Las enzimas ligninolíticas se midieron como se indica en el capítulo 1, reemplazando los sobrenadantes de cultivo líquido por extractos de medio sólido refiriendo las unidades a la masa de medio utilizada.

### **2.2.9 Análisis estadístico**

Los cultivos fueron realizados por duplicado. Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado, los datos corresponden a la media con su correspondiente error estándar. Cuando se indica el error “ $\alpha$ ” se realizó una prueba T de student. El Software utilizado fue Graph Pad Prism con excepción de los ajustes sigmoidales que se hicieron con Sigma Plot.

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 El inóculo**

La semilla (inoculo final) quedó siempre completamente invadida en diez días (24 C). Los frascos tuvieron que ser golpeado diariamente para evitar que se formara una masa compacta que dificultaba la inoculación. La frecuencia de contaminación en la semilla fue muy alta cuando el tiempo de autoclavado no superaba la hora, pero por encima de este tiempo, no hubo frascos contaminados. De acuerdo a los porcentajes de semilla utilizados (3% y 10%), se observaron diferencias respecto a los eventos de contaminación, dado que hubo mayor porcentaje de contaminación en el primer caso (70 % de bolsas con contaminación evidente ) que en el segundo (8% de bolsas con contaminación evidente).

### **2.3.2 Los cultivos**

Los experimentos de fructificación se realizaron inicialmente con las cepas S y E47. Ambas produjeron primordios, pero éstos abortaron en la cepa S al comenzar la fase de elongación en todas las condiciones ensayadas, por lo que el resto de los ensayos se llevaron a cabo con la cepa E47. Los resultados detallados a continuación, se resumen en la tabla 1.

- Influencia del sustrato

La producción de cuerpos fructíferos (medida como eficiencia biológica como se explica en materiales y métodos) fue mayor en el cultivo sobre chips más aserrín de álamo, aunque la diferencia con aserrín mas chips de pino no fue muy notoria aunque sí significativa ( $\alpha < 0.05$ ). Ambos cultivos duplicaron la productividad

comparados con aquellos realizados sobre aserrín solo (utilizando también pino y álamo), como lo muestra la figura 1. La frecuencia de contaminación del aserrín y de la mezcla con chips fue casi nula a partir de las dos horas de autoclavado en frascos de dos litros con 80 % de humedad, tiempos menores de autoclavado no fueron efectivos. Se ensayó la esterilización del aserrín con peróxido de hidrógeno al 2%, pero esto no evitó la contaminación (datos no se muestran).

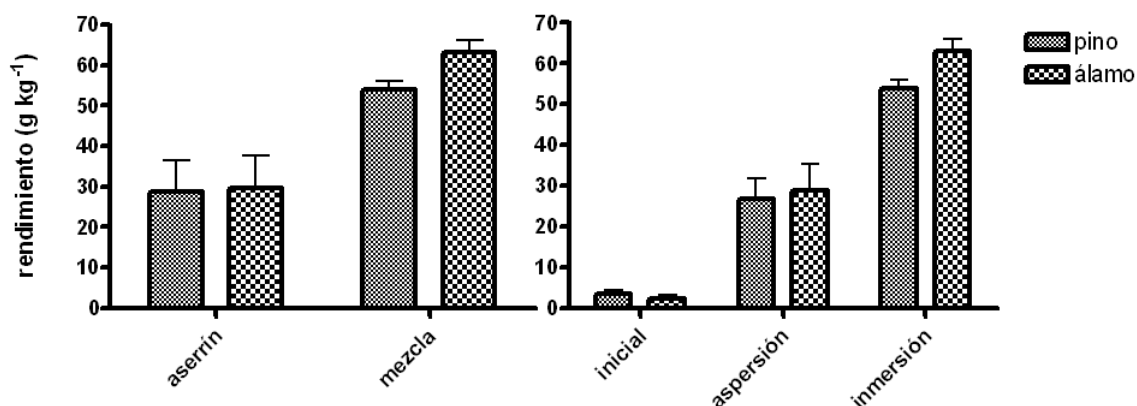


figura 28: Rendimientos en sustratos de pino y álamo en distintas condiciones. A la derecha se comparan la mezcla de chips + aserrín, con el aserrín solo, ambos en hidratados por inmersión. A la derecha se comparan las formas de provisión de agua. Ver explicación en el texto.

- Humedad

El factor que más afectó a la eficiencia biológica fue la forma de aplicación de la humedad a partir de la apertura de las bolsas. El cultivo con la humedad inicial (80%) se detuvo en la formación de primordios a pesar de haberse mantenido en un ambiente húmedo. Este tipo de riego se ensayó también con bolsas con perforaciones laterales para la salida de cuerpos fructíferos (4), pero éstos abortaron antes de la elongación. Este método mostró formación de estípites alargados de hasta 5 cm deteniéndose durante la formación del sombrero. Se utilizó agua estéril hasta la aparición de los primordios y luego agua corriente. La inmersión se realizó cortando las bolsas en su parte inferior y manteniéndolas



sumergidas hasta 6 cm (aprox.) durante todo el cultivo. Con este sistema se alcanzó el mayor rendimiento, sin que se detuviera el crecimiento en ninguna etapa, con el único inconveniente de la mayor incidencia de contaminación por diseminación de esporas a través del agua.

- Efecto de la Luz

La forma de los cuerpos fructíferos se vio afectada por la iluminación (ver figura 2). Luego de tres días de haberse abierto las bolsas, aparecían los primeros primordios consistentes en masas globosas cubiertas por himenio poroide. En los cultivos mantenidos en la oscuridad, no hubo mayor diferenciación, sino un crecimiento en superficie a modo de



**figura 29: cultivos en bolsa. (a) Primordios comenzando su expansión en luz fluorescente y (b) en luz incandescente. (c y d) Cuerpos fructíferos desarrollados completamente bajo luz fluorescente. (e) sombrero desarrollado bajo luz incandescente desde el comienzo de su expansión. obsérvense las áreas opacas que corresponden a la acumulación de esporas . (c) Fructificación ramificada. Ver explicación en el texto.**

basidiomas resupinados. En los expuestos a luz de baja intensidad Baja ( $50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante ocho horas diarias, los primordios sufrieron una elongación, cubriéndose de laca rojiza en toda la superficie menos en el extremo de crecimiento activo. Entre los días 7 y 12 el elongamiento se detuvo y comenzó la

expansión de un sombrero anómalo, grueso y con el himenio expuesto hacia arriba y sin ramificaciones aún en cultivos envejecidos. Se cambió la iluminación por luz de mayor intensidad ( $350 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante el mismo tiempo y se observó la proliferación de micelio blanco por sobre el himenio desde los márgenes, el crecimiento lateral aplanado y, luego de cuatro días, el desarrollo de himenio en posición normal. Se probó la efectividad de incrementar la intensidad de luz desde la aparición de los primordios, pero produjo en todos los casos el laqueado de toda la superficie y el cese del crecimiento. Se produjeron cuerpos fructíferos normales en los cultivos que se transfirieron a luz de baja intensidad al abrirse la bolsa, y a luz de alta intensidad al detenerse la elongación de los primordios.

			COLONIZACIÓN	LACA EN BOLSA	HIMENIO LIBRE	PRIMORDIOS	ESTIPTES	PILEO ANORMAL	PILEO NORMAL	RAMIFICACIONES	SEGUNDA OLEADA		
Á L A M O	A S E R R Í N	HUMED. INICIAL	OSC.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
			B.I.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
			A.I.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		RIEGO	OSC.	+	+	-	+	+			-	-	+
			B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+
			A.I.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
		INMERS.	OSC.	+	+	+	+	+		-	-	-	+
			B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+
			A.I.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	M E Z C L A	HUMED. INICIAL	OSC.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
			B.I.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
			A.I.	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
RIEGO		OSC.	+	+	+	+	+	+		-	-	+	
		B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+	
		A.I.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
INMERS.		OSC.	+	+	+	+	+		-	-	-	+	
		B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+	
		A.I.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
P I N O	A S E R R Í N	HUMED. INICIAL	OSC.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
			B.I.	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
			A.I.	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		RIEGO	OSC.	+	+	-	+	+			-	-	+
			B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+
			A.I.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
		INMERS.	OSC.	+	+	+	+	+		-	-	-	+
			B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+
			A.I.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	M E Z C L A	HUMED. INICIAL	OSC.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
			B.I.	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
			A.I.	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
RIEGO		OSC.	+	+	+	+	+			-	-	+	
		B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+	
		A.I.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
INMERS.		OSC.	+	+	+	+	+		-	-	-	+	
		B.I.	+	+	+	+	+	+		-	-	+	
		A.I.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	

Tabla 5: resumen de los resultados de los cultivos en bolsa en distintas condiciones. Osc: oscuridad, A.I.: alta intensidad de luz B.I.: baja intensidad de luz. Ver explicación en el texto.

### 2.3.3 Caracterización de la bioconversión

Para evaluar la bioconversión del material lignocelulósico en polisacáridos, se separaron las fracciones de distinta solubilidad como se indica en materiales y métodos, y se las cuantificó, observándose proporciones semejantes en pino y en álamo. Los extractivos en agua fría y caliente del cuerpo fructífero son en su mayoría los polisacáridos a los que se atribuye el valor medicinal, y la bioconversión alcanzada en álamo y en pino es de 16,5 y el 17,7 g / kg respectivamente.

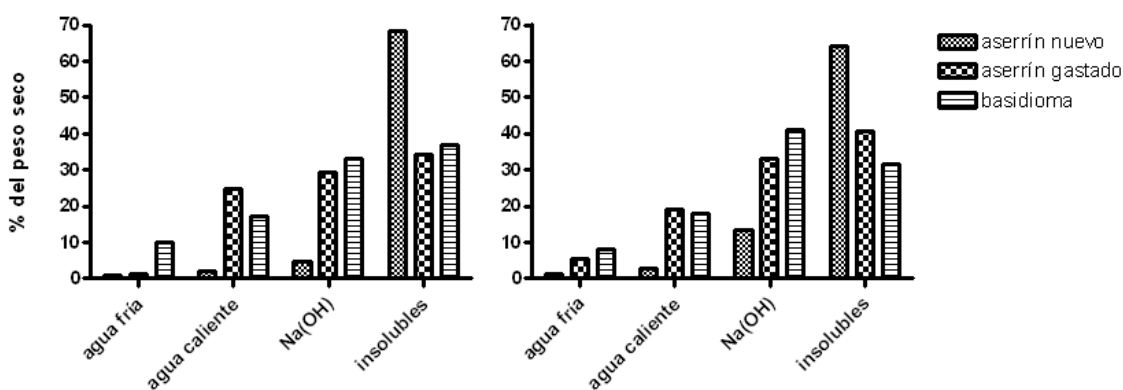


figura 3: componentes d medio nuevo y gastado y del basidioma en los cultivos en madera de pino (izquierda) y álamo (derecha) separados según su solubilidad. Ver explicación en el texto.

La cantidad de primordios y consecuentemente de cuerpos fructíferos varió de 5 a 12 por bolsa cuando estas se abrieron por completo. Las bolsas a las que se quitó el tapón de algodón pero no el cuello plástico, produjeron una sola fructificación de mayor tamaño.

El sustrato gastado se utilizó como fuente de enzimas para las experiencias de decoloración. Estos resultados se detallan en el capítulo 3.

### 2.3.4 Caracterización del crecimiento en medio sólido

La estimación de crecimiento en medios sólidos se realizó cuantificando la pérdida de peso seco y la quitina, como se indica en materiales y métodos.

Ambos parámetros mostraron un ajuste a dinámicas logísticas con una dispersión de puntos relativamente alta por tratarse cada muestra de un cultivo independiente.

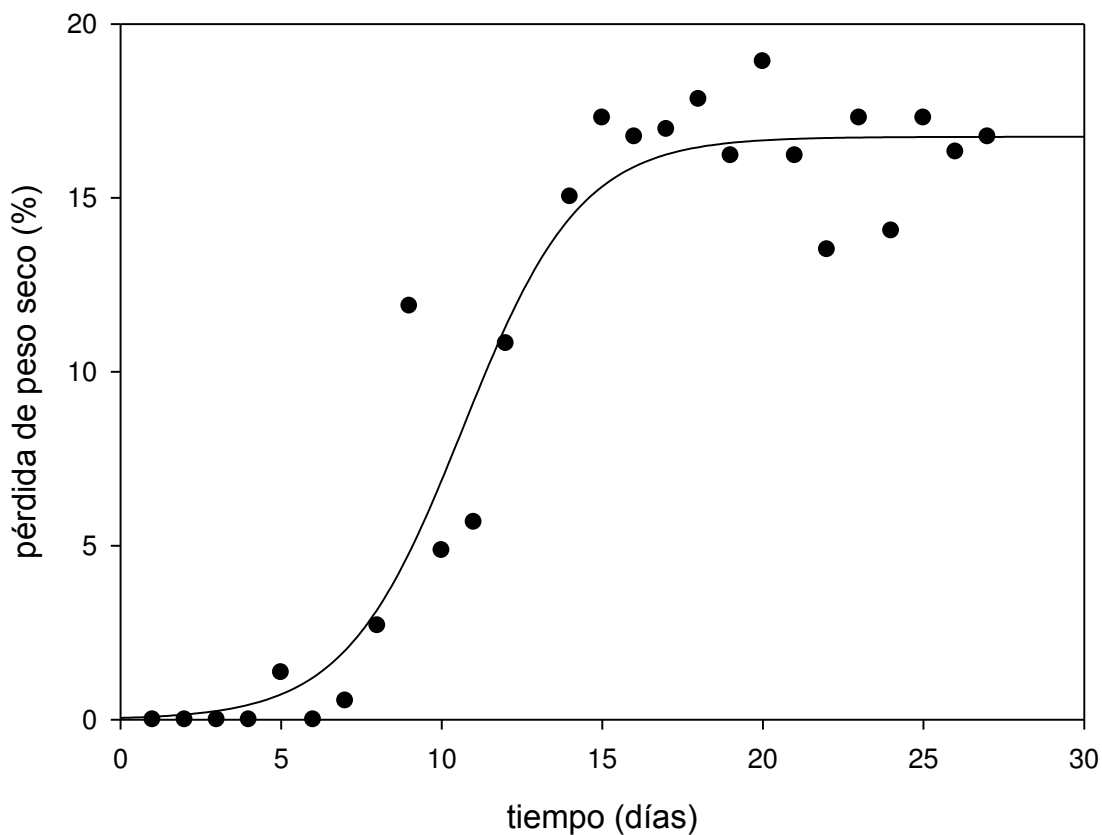
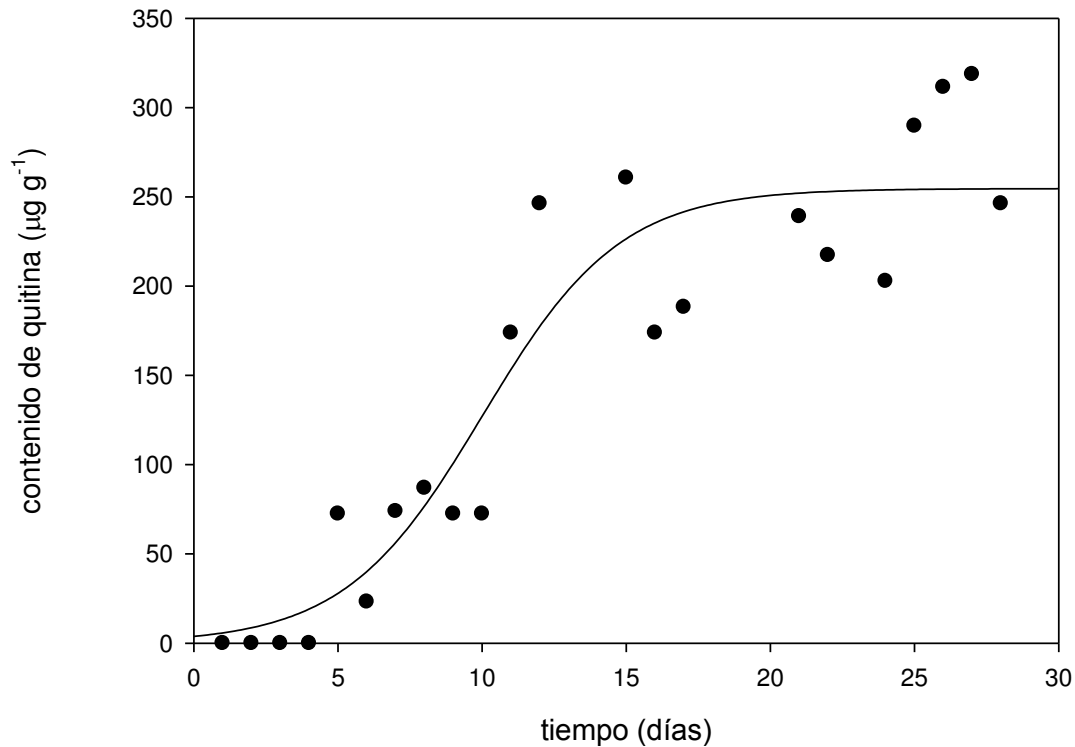


figura 4: pérdida de peso seco de los cultivos en aserrín de álamo y aproximación a la dinámica logística de crecimiento. Cada punto corresponde a un cultivo independiente.  $R^2=0,8719$

La figura 9 muestra la dinámica de la pérdida de peso seco aproximada a una ecuación logística con una explicación  $R^2=0,8719$ . Se observa el punto de inflexión entre los días 11 y 12 y al día 20 se estabiliza la pérdida de peso seco alrededor del 17%.



**figura 5: Contenido de quitina de los cultivos en aserrín de álamo y aproximación a la dinámica logística de crecimiento. Cada punto corresponde a un cultivo independiente.  $R^2= 0,9257$**

En la figura 6 se muestra el cambio en el contenido de quitina de los mismos cultivos y su aproximación a la dinámica logística con una explicación  $R^2= 0,9257$ . El punto de inflexión se observa, al igual que en el caso del peso seco, entre los días 11 y 12 y la estabilización del contenido se alcanza el día 20 alrededor de  $250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

El contenido porcentual de lignina del medio también se analizó y el resultado se muestra en la figura 6.

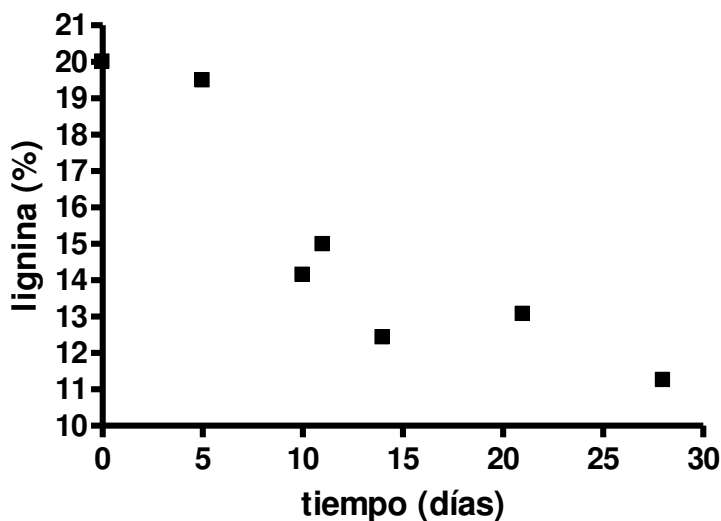


figura 6: contenido de lignina de cultivos independientes en aserrín de álamo medido según el protocolo indicado en las normas TAPPI.

No se ha aproximado este crecimiento a ninguna dinámica conocida por falta de ajuste a los modelos ensayados. De cualquier manera los resultados de la figura 6 sugieren una deslignificación progresiva considerable del medio sólido que puede adjudicarse a la acción de la maquinaria enzimática ligninolítica que, en el caso de *Ganoderma*, está representada casi exclusivamente por la lacasa.

### **2.3.5 producción de enzimas hidrolíticas**

El contenido de azúcares reductores medidos por el método de Somogy Nelson mostró un incremento (figura 7a) a lo largo del cultivo. Se estudió la producción de las enzimas hidrolíticas endoglucanasa (figura 7b) y endoxilanasas (figura 7c)



como indicadores de la actividad hidrolítica general en los cultivos y adicionalmente la lacasa (figura 7d) en relación con el proceso de ligninólisis.

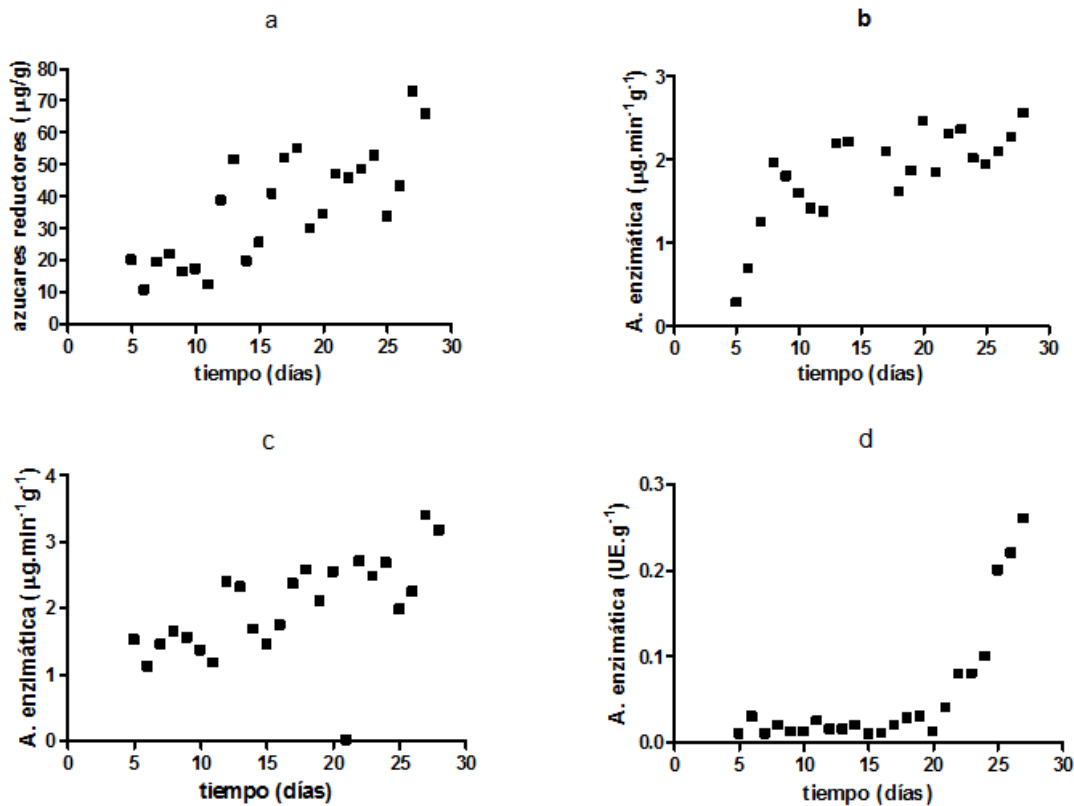


figura 7: a cambio en el contenido de azúcares reductores; b actividad de las enzimas endoglucanasa; c endoxilanasas y d lacasa.

A pesar de mostrar una alta dispersión por tratarse de cultivos independientes, se observa un rápido incremento de la actividad de las enzimas hidrolíticas desde los primeros días del cultivo acompañada por un incremento en la liberación de azúcares reductores. La ligninólisis se retrasa y el incremento en la actividad lacasa se observa a partir del día 20, coincidiendo con el plateau de las figuras 4 (pérdida de peso seco) y 5 (contenido de quitina) indicando que también en medio sólido la lacasa es un producto de la idiofase ligado al metabolismo secundario.

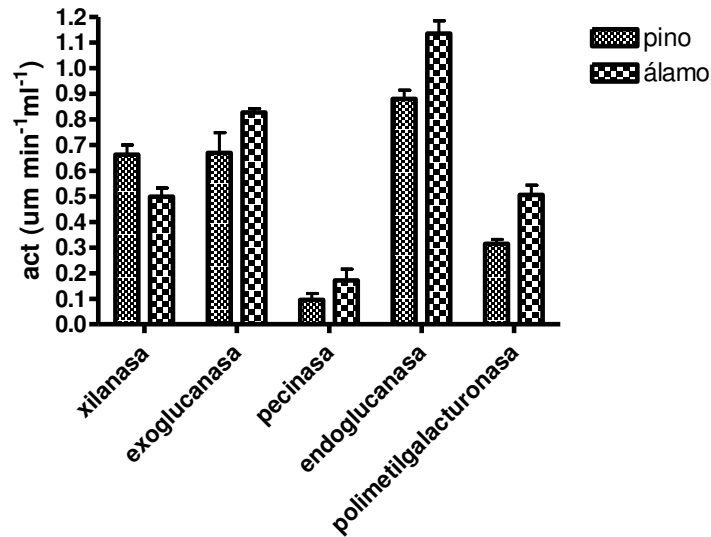


figura 8: enzimas hidrolíticas extraídas de sustrato gastado de cultivo de la cepa E47 luego de la cosecha de cuerpos fructíferos

Se cuantificaron las actividades de cinco enzimas hidrolíticas (endoxilanasa, exoglucanasa, pectinasa, endoglucanasa y polimetilgalacturoinasa) en los medios de cultivo gastados, luego de la cosecha de los cuerpos fructíferos. Los resultados mostrados en la figura 8 indican que las principales contribuyentes al pool de azúcares reductores medidos son la endo y la exoglucanasa, degradadoras de la celulosa, seguidas de la xilanasa (endoxilanasa). Ambas celulasas muestran una actividad mayor en aserrín de álamos que en aserrín de pino ( $\alpha > 0.05$ ). Las pectinasas muestran actividades significativamente menores que las demás enzimas ( $\alpha > 0.05$ ), (excepto xilanasa pino – plimetilgalacturonasa pino).

### 2.3.6 Cultivos en presencia de cobre

Se hicieron cultivos en aserrín más chips hidratados con una solución de  $\text{CuSO}_4$  10 mM como inductor de la ligninólisis tal como se indica en materiales y métodos. La invasión fue mucho más lenta que en los controles (apreciación visual), el

micelio menos denso, y los primordios de fructificación nunca pasaron a la etapa de elongación, siendo además de menor tamaño.

Además los cultivos con cobre presentaron mayor frecuencia de contaminaciones con *Penicillium* sp. probablemente debidas al lento desarrollo inicial del micelio de *G. lucidum* en presencia del metal.

Se realizaron pruebas cualitativas de actividad de enzimas hidrolíticas para ver el efecto del cobre sobre ellas.

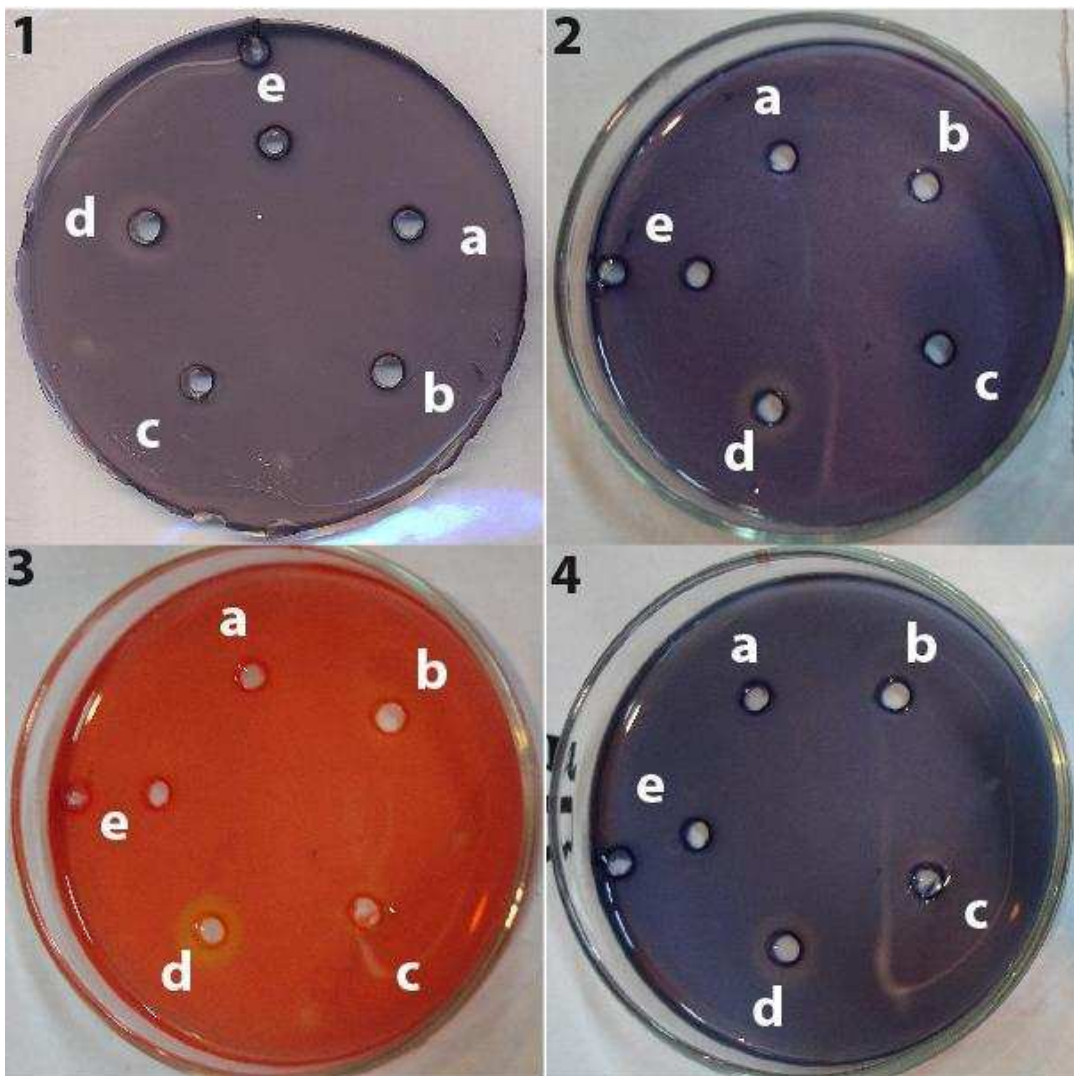


figura 9 ensayos cualitativos de enzimas hidrolíticas: 1 amilasas; 2 celulasas; 3 xilanasas; 4 pectinasas; a control; b extracto de medio gastado pino; c id. b con cobre 10 mM; d extracto de medio gastado álamo; e id. d con cobre 10 mM.

En la figura 9 se observan los resultados de estos ensayos. Tal como se mostró en la figura 8, las actividades hidrolíticas son mayores en sustrato de álamo que en pino (b y d) siendo los halos de degradación en pino difíciles de observar por su pequeño diámetro. Los cultivos con cobre no mostraron ningún halo de degradación, indicando la baja actividad de enzimas hidrolíticas. Esta baja producción probablemente se daba al crecimiento disminuido del micelio por la presencia de cobre.

Como indicador de crecimiento se cuantificó la pérdida de peso seco en cultivos 25 días de duración (figura 12b) y se lo relacionó con la actividad de la enzima lacasa (figura 12a). Se observa en pino una mayor pérdida de peso en los cultivos sin cobre que en los adicionados con este elemento. En álamo las diferencias no son significativas.

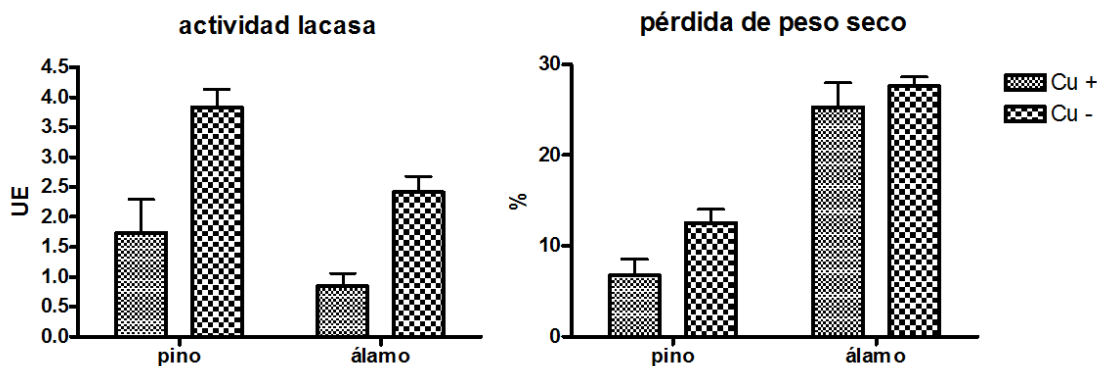
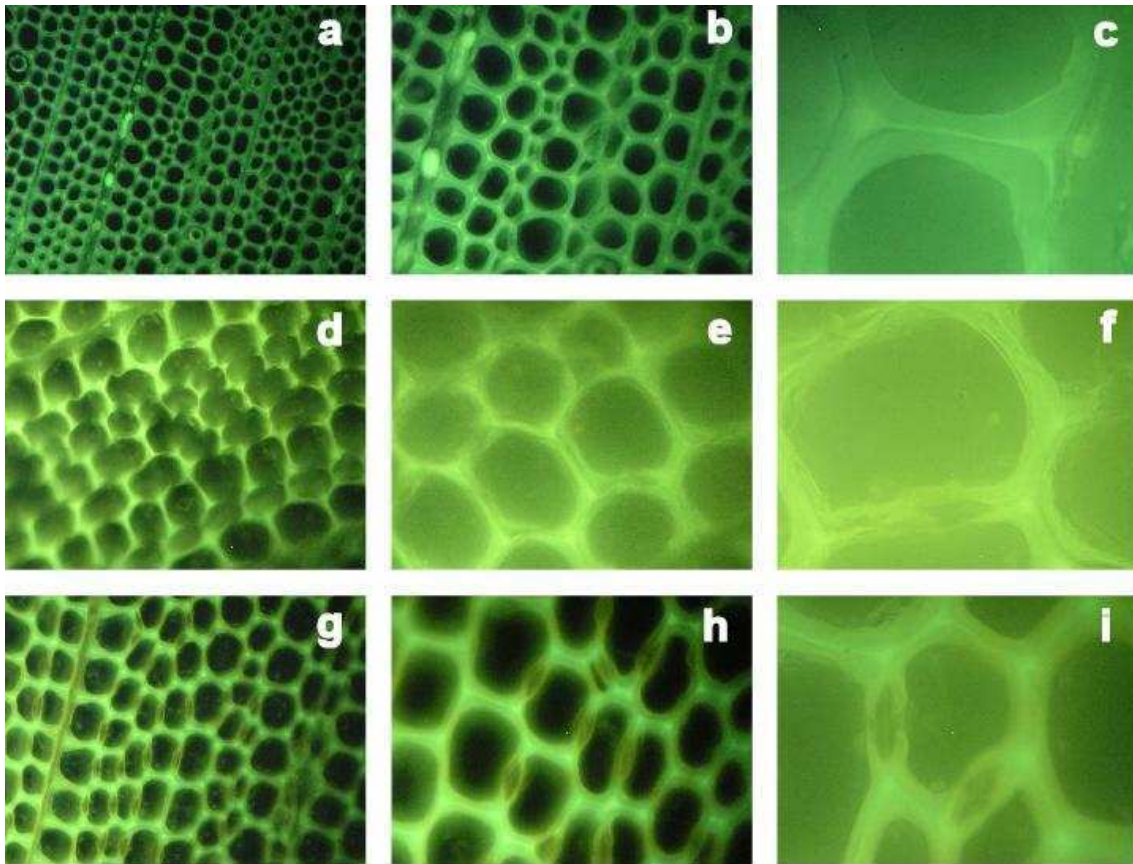


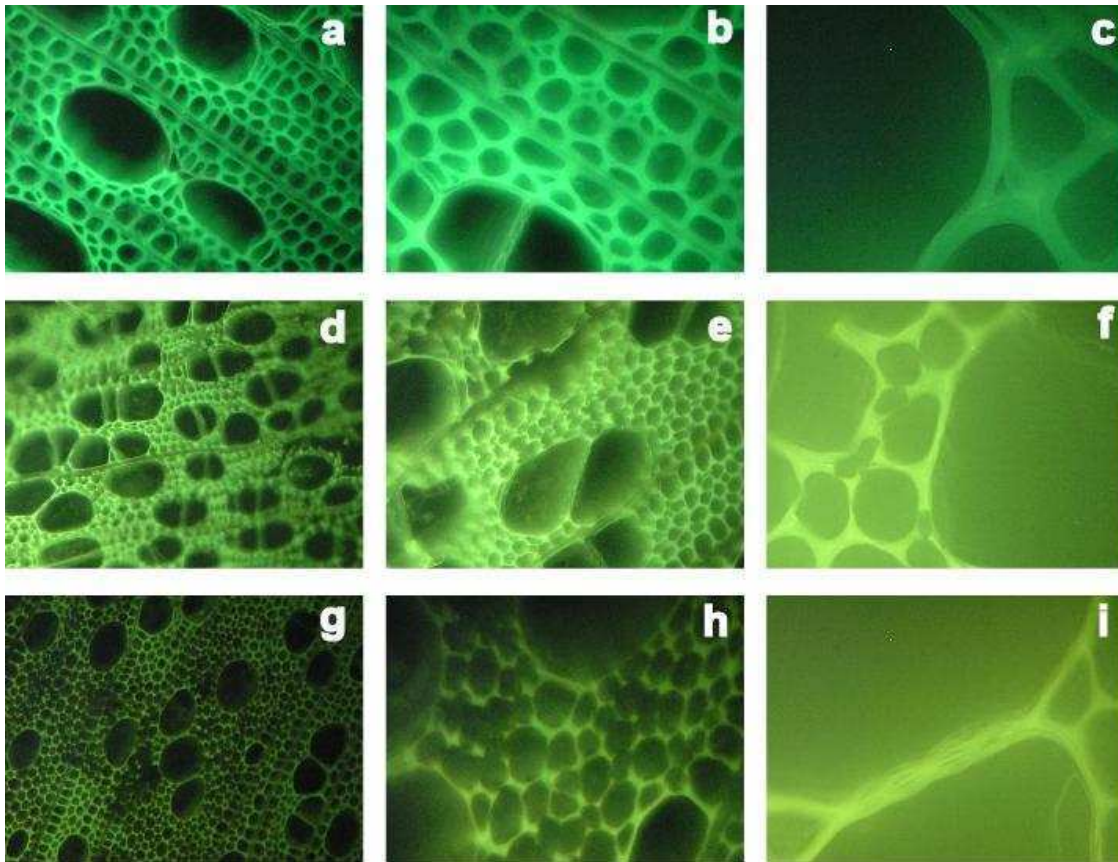
figura 12: actividad lacasa y pérdida de peso seco en madera de pino y álamo luego de 30 días de cultivo.

Se realizaron preparados de microscopía de cortes transversales de los chips de madera de pino y álamo tratados durante un mes con *G. lucidum* en presencia y ausencia de cobre para evaluar la degradación en relación con la presencia de este compuesto en vista de los resultados expuestos en el capítulo 1 sobre la inducción de la lacasa con iones metálicos.



**figura 10: degradación de la madera de pino (chips) por parte de la cepa E47 de *Ganoderma lucidum*: a-c madera sin tratar; d-f madera luego de un mes de crecimiento miceliar; g-i madera luego de un mes de crecimiento miceliar en presencia de cobre 10 mM.**

La figura 10 muestra imágenes de fluorescencia de los cortes transversales de la madera de pino. Se observa en los controles una alta fluorescencia en particular asociada a las laminillas medias, donde el contenido de lignina es mayor. En ambos tratamientos se evidencia un descenso de la fluorescencia de las laminillas medias en relación con las paredes celulares característica de las pudriciones blancas. En ausencia de cobre se observa una degradación mayor de las paredes celulares coincidente con los ensayos cuantitativos de enzimas hidrolíticas y el daño total de algunas regiones del tejido. En los tratamientos con cobre la degradación es menor, debido probablemente a la menor actividad de las enzimas hidrolíticas. Además se ve deslignificación en las zonas correspondientes a las puntaciones areoladas de las fibras, sitio preferencial de penetración de las hifas en este tipo de ataque.



**figura 30: degradación de la madera de álamo (chips) por parte de la cepa E47 de *Ganoderma lucidum*: a-c madera sin tratar; d-f madera luego de un mes de crecimiento miceliar; g-i madera luego de un mes de crecimiento miceliar en presencia de cobre 10 mM.**

El mismo patrón de pérdida de fluorescencia de las laminillas medias se observa en la madera de álamo (figura 11) acompañado de debilitación de los radios parenquimáticos. En el tejido tratado con cobre se observan manchones de designificación debidos probablemente a la inducción de la enzima lacasa por este elemento y la consecuente ruptura de las paredes celulares.

### **2.3 Discusión**

La fuertes interacciones de competencia interespecíficas explican en gran parte las contaminaciones observadas en los cultivos inoculados con menor porcentaje de blanco de semilla. Cuanto mayor es la biomasa de hongo mayor será la eficiencia en la competencia (14).

Las condiciones de cultivo indicadas por Stamets (1993) son adecuadas para el crecimiento de la cepa E47 en maderas de pino y álamo, pero la humedad requerida a lo largo de todo el proceso no es suficiente para lograr fructificaciones normales ni un buen rendimiento por lo que es recomendable la inmersión permanente de las bolsas como método de humidificación, además del mantenimiento de la humedad del aire elevada. Asimismo no se reporta en la literatura la formación invertida del himenio (hacia arriba) en condiciones de baja luminosidad. Este fenómeno no afectaría la producción de biomasa de cuerpos fructíferos para extractos, polvos u otra forma de fraccionamiento, pero sí a la comercialización de la fructificación entera, cuya forma armónica es una de las características más valoradas por las culturas orientales y el mercado.

la tabla 2 resume las condiciones en las que se obtuvieron los mejores rendimientos con nuestra cepa en los sustratos descritos. El origen del sustrato lignocelulósico no parece ser determinante teniendo en cuenta la diversidad de medios descritos (2,4) y nuestra comparación entre dos maderas áltamente diferentes en su composición química.

etapa	duración	estímulo	iluminación	humedad	aireado
colonización del sustrato	10 a 12 días	ninguno	ninguna	interna	bolsa cerrada
formación de primordios	2 a 3 días	exposición al a	ninguna	inmersión	bolsa abierta
elongación	7 a 12 días	luz	tenue	inmersión	bolsa abierta
expansión	18 a 23 días	luz	intensa	inmersión	bolsa abierta

**Tabla 6: resumen de las condiciones de cultivo en las que se obtuvo los mejores rendimientos.**

El efecto de la luz sobre la morfología y el tamaño de los basidiomas fue estudiado en varios hongos, particularmente se sabe que es uno de los factores más críticos para la inducción de la formación del píleo en *Coprinopsis cinerea* y *Pleurotus ostreatus* (15). En *Flammulina velutipes* la elongación del estípite, el desarrollo del píleo y la pigmentación de los basidiomas está fuertemente influenciado por la calidad y la cantidad de luz. Similar a lo observado en *F. velutipes*, en la cepa E47 la estimulación por luz luego de formado el basidioma (estimulación lumínica secundaria) induce el desarrollo normal del himenio (16).

La estimulación de la producción de lacasa por metales pesados y en especial por cobre fue discutida en el capítulo 1 y se confirmó en el presente capítulo la validez de esos resultados en los cultivos en medio sólido en *Ganoderma lucidum* coincidiendo con lo reportado en la bibliografía (17-20) para muchos géneros de hongos de la pudrición blanca.



## Referencias

1. J. Simonic, J. Vukojevic, M. Stajic, J. Glamoclija, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 408 (2010).
2. R. González Matute, D. Figlas, R. Devalis, S. Delmastro, N. Curvetto, *Micologia Aplicada Internacional* **14**, 19 (2002).
3. P. Stamets, (1983).
4. P. Stamets, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms: Shokuy+ì Oyobi Yakuy+ì Kinoko No Saibai: a Companion Guide to The Mushroom Cultivator* (Ten Speed Press, 1993).
5. C. S. Plassard, D. G. Mousain, L. E. Salsac, *Phytochemistry* **21**, 345 (1982).
6. W. W. Donald, C. J. Mirocha, *Cereal chemistry* **54**, 466 (1977).
7. A. Ekblad, H. Wallander, T. N+ñsholm, *New Phytologist* **138**, 143 (2008).
8. Y. Sakamoto, K. Nakade, T. Sato, *Curr. Genet.* **55**, 409 (2009).
9. S. Ohga, D. J. Royse, *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 111 (2001).
10. H. Palonen, L. Viikari, *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 550 (2004).
11. P. Rani, N. Kalyani, K. Prathiba, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **151**, 151 (2008).
12. O. S. Isikhuemhen, N. A. Mikiashvili, V. Kelkar, *Biodegradation.* **20**, 351 (2009).
13. S. S. Hwang *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1819 (2008).
14. D. B. Redfern, S. C. Gregory, G. A. MacAskill, *Scandinavian Journal of Forest Research* **12**, 41 (1997).
15. S. R. Lee *et al.*, *J. Microbiol.* **49**, 71 (2011).
16. Y. Sakamoto, A. Ando, Y. Tamai, T. Yajima, *Fungal. Genet. Biol.* **44**, 14 (2007).
17. C. Galhaup, D. Haltrich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 225 (2001).
18. L. Levin, F. Forchiassin, A. M. Ramos, *Mycologia.* **94**, 377 (2002).
19. M. C. Saparrat, F. Guillen, A. M. Arambarri, A. T. Martinez, M. J. Martinez, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1534 (2002).

20. S. Chen, D. Ma, W. Ge, J. A. Buswell, *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 143 (2003).

## Capítulo 3: Degradación de colorantes industriales

### 3.1 Introducción

Con el fin de producir un producto de calidad, la industria textil ha desarrollado un número de pigmentos recalcitrantes que se han convertido en una preocupación ambiental, pues, debido a las limitaciones financieras que plantea en el tratamiento de colorantes industriales, estos se desechan en el medio ambiente. Estos compuestos coloreados son contaminantes visuales, además de presentar diversos grados de toxicidad. La estructura aromática compleja de los colorantes los hace resistentes a la luz, a la degradación y a otras condiciones ambientales degradativas. Así, el tratamiento convencional de aguas residuales sigue siendo ineficaz para este tipo de contaminación. (1)

Existen varios métodos para el tratamiento de aguas residuales textiles para la eliminación de tinte. Estos pueden clasificarse en tres categorías: físicas, químicas y biológicas. Estos métodos han sido revisados ampliamente (2, 3) La principal desventaja de los métodos fisicoquímicos ha sido en gran parte debido al alto costo, la baja eficiencia, la limitada versatilidad y la interferencia por los componentes de aguas residuales y el manejo de los residuos generados. Por esto, la degradación microbiana está recibiendo en las últimas décadas mayor atención. Además ha demostrado ser una alternativa rentable debido a los desarrollos científicos en este campo (4-8).

El papel de los hongos en el tratamiento de aguas residuales de diversas industrias ha sido ampliamente investigado (4, 6, 9-11). Los hongos ha demostrado ser organismos adecuados para el tratamiento de eliminación de aguas textiles y colorantes. Estos presentan una ventaja sobre las células de otros organismos ya que pueden acceder a compuestos inaccesibles mediante la

producción de enzimas extracelulares. Además, debido a su forma de crecimiento filamentoso los hongos tienen un mayor contacto físico con el medio ambiente que los rodea. La naturaleza extracelular de estas enzimas es también ventajosa ya que toleran altas concentraciones de las sustancias tóxicas. Muchos géneros de hongos han sido empleados para la degradación de colorantes, ya sea in vivo o a través de extractos o sobrenadantes. (2, 4, 12-21)

Basándose en el mecanismo involucrado estos estudios se pueden agrupar bajo los procesos de biosorción, biodegradación y bioacumulación (1).

La biosorción se define como la unión de solutos a la biomasa mediante procesos que no involucran energía metabólica o de transporte, aunque estos procesos pueden ocurrir simultáneamente, cuando se utiliza biomasa viva. La bioacumulación es la acumulación de contaminantes en las células que crecen activamente. Los resultados concernientes a biosorción y bioacumulación por parte de las cepas utilizadas en el presente trabajo se tratan en el capítulo 4.

Biodegradación se define como la descomposición de los compuestos químicos mediada biológicamente. Cuando biodegradación se completa, el proceso ha llegado a la mineralización es decir, la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono del agua, y / o cualquier otro producto inorgánico terminal. La biodegradación es un proceso dependiente de la energía e implica la ruptura de un colorante en diversos productos por medio de la acción de varias enzimas.

La mayor parte de los trabajos relacionados con la biodegradación de colorantes textiles por hongos se concentra en el uso de especies causantes de pudrición blanca, esto es, capaces de degradar la lignina (2, 15, 18, 20, 22, 23), mientras que en los otros procesos citados, se han utilizado especies de otros grupos ecológicos ya que la degradación y mineralización completas de colorantes es eficaz por ciertos hongos de pudrición blanca. Las enzimas ligninolíticas secretadas por estos hongos atacan de forma no específica al sustrato (24), por lo tanto, pueden degradar una amplia variedad de compuestos recalcitrantes y

mezclas complejas de contaminantes incluso incluyendo tintes. Dado que estas enzimas son extracelulares, la limitación de la difusión del sustrato en la célula que se encuentran en las bacterias, no se observa en los hongos.

Una de las consecuencias de este tipo de nutrición es que no se requiere en este tipo de organismos un preacondicionamiento a la exposición a los contaminantes (1).

Las enzimas involucradas en la degradación de los colorantes son principalmente enzimas modificadoras de la lignina tales como la lacasa, la manganeso peroxidasa (MnP), la lignin peroxidasa (LIP) y la tirosinasa. Con el fin de diferenciar entre el fenómeno de biosorción y la biodegradación durante la extracción de tinte, la presencia de actividad enzimática tiene que ser comprobada.

Rodríguez et al. (25) comprobaron que varios colorantes industriales se decoloran biocatalíticamente por hongos de podredumbre blanca cultivados en avena y encontró que la capacidad de decoloración se correlacionó principalmente con los niveles actividad la enzima lacasa. En su trabajo, *Trametes hispida* tuvo la mayor actividad volumétrica decoloración y la lacasa purificada de este hongo fue capaz de decolorar los mismos colorantes sintéticos in vitro.

Las enzimas ligninolíticas fúngicas dependen de factores del entorno tales como la temperatura y el pH, a pesar de ser activan en un amplio rango de condiciones. En especial muestran una actividad máxima a pH bajo por lo tanto, la decoloración del colorante es eficiente También se observa en medios ácidos. Se ha reportado que el pH óptimo crecimiento de *Coriolus versicolor* sería de 4,5. La más alta eficiencia de decoloración (99%) también se obtuvo a pH 4,5 que disminuyó a 50% a pH 6 y 7 (26). Este y muchos otros trabajos (27-30) permiten concluir que para la mayoría de los hongos el pH óptimo para la degradación de colorantes se encuentra en el intervalo ácido. Sin embargo, un pH tan bajo no siempre es adecuado para el tratamiento de aguas residuales y, por tanto, la cepa fúngica

adecuada para aplicaciones industriales debe mostrar un rango de actividad relativamente amplio.

Otro factor que influye sobre la eficiencia de los procesos de biodegradación de colorantes es la presencia de mediadores de oxidorreducción (31, 32) tales como el HBT (hidroxibenzotriazol) o el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Aunque los resultados citados en la bibliografía son muy promisorios en esta dirección, la capacidad de actuar sin la presencia de los mediadores constituye también una capacidad apreciada a nivel industrial (33)

El crecimiento de los hongos se puede efectuar en presencia de colorantes en concentraciones tóxicas. Esto también tiene un efecto sobre la eficiencia del proceso (34). Además de los colorantes, varios metales pesados forman una parte de las aguas textiles ya que se los utiliza para mejorar la unión del colorante con la fibra. Su influencia en la capacidad degradativa del hongo también ha sido estudiada (35, 36).

El género *Ganoderma* es conocido como productor de lacasa (el estado del conocimiento actual sobre las lacasas del género se reseña en la introducción y discusión del capítulo 1). Su aplicación en el campo de la biodegradación es conocida (37-39) pero la degradación de colorantes textiles ha sido hasta el momento poco ensayada, Zhuo et al. (40) evalúan en su reciente trabajo la capacidad biodegradatoria de un aislamiento de éste género frente a cuatro colorantes y lo correlacionan con la actividad de la enzima lacasa, caracterizando la funcionalidad del gen de esta enzima a través de clonación y secuenciación. El efecto de los metales pesados en la actividad lacasa se había relacionado en un trabajo previo con la decoloración por parte de *G. lucidum* (35) con buenos resultados. Murguesan et al. (41) estudiaron la influencia de los compuestos fenólicos en la degradación de verde de malaquita por parte de este hongo. Además existen numerosos reportes de degradación y detoxificación exitosa de diversos compuestos tales como benzoato (42), o pentaclorofenol (43).

### **3.2 Materiales y Métodos**

Las cepas y los medios de cultivo son los reseñados en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 1.

Los ensayos en medio agarizado se realizaron en placas de Petri conteniendo medio GG-agar detallado en el cap. 1.

Los colorantes en estos ensayos se agregaron a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . por triplicado y se tomaron medidas de crecimiento en radio hasta que cubrieran la placa. También se tomaron medidas del halo de decoloración en dos ejes perpendiculares, registrándose el promedio de las dos medidas como un dato. Los cultivos se mantuvieron vivos un mes y finalmente se volvió a medir el halo de decoloración.

El screening inductores de la decoloración se realizó agregando los colorantes sobrenadantes de cultivo de 20 días en estado líquido (50 ml) que contenían cada inductor Junto con el medio GG. A las absorbancias registradas inicial y finalmente se les restó la del medio del sobrenadante a la misma longitud de onda de cada colorante a modo de blanco. Se consideraron positivos los descensos de absorbancia mayores al 10 % en una hora.

Los ensayos con sobrenadante de medio líquido y extracto de medio sólido se llevaron a cabo a la concentración de 50 mM para todos los colorantes, menos para el violeta de genciana y el RBBR que se hicieron a 25  $\mu\text{M}$  para no exceder el rango del espectrofotómetro. Los mediadores HBT y ABTS se agregaron a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Se agregó en todos los casos 0.5 mililitros de

sobrenadante de cultivos de 25 días o extracto de medio sólido gastado de 30 días de cultivo.

Las mediciones de absorbancia se realizaron llevando cada colorante a pH 6 como convención para evitar los cambios de color a distintos pH.

La decoloración con medio sólido gastado se ensayó con medio aserrín de pino y álamo con y sin  $\text{CuSO}_4$  10 mM. La diferencia entre degradación y adsorción se evaluó como diferencia entre las decoloraciones en presencia y ausencia de azida sódica (0.05%) para inhibir la decoloración asociada a metabolismo enzimático.

El ensayo de detoxificación fue llevado a cabo decolorando soluciones de verde de malaquita 0.1 y 0.4 mM con sobrenadantes de 25 días de cultivo enriquecido con cobre 0.5 mM. La mezcla decolorada se utilizó diluida al 5% para producir un medio de cultivo GG e inocularlo con *Phanerochaete chrysosporium*. Se comparó el crecimiento de este organismo en la mezcla detoxificada y en la mezcla sin detoxificar. Como control se utilizó un cultivo en GG-agar.



### **3.3 Resultados**

#### **3.3.1 Ensayos en medio agarizado**

El screening realizado en medio agarizado reveló que de los colorantes ensayados, sólo el RBBR, la xilidina, el índigo carmín y el rojo congo son activamente degradados en poco (menos de cinco días) tiempo por ambas cepas (figura 1 y 2). El verde de malaquita se degrada más lentamente y de manera más difusa y el azure B y el violeta de genciana no son decolorados en los cinco días de duración de la experiencia. Además, puede verse que los trifenilmetanos (verde de malaquita y violeta de genciana) hacen mucho más lento el crecimiento de ambas cepas *Ganoderma lucidum*, debido a la genotoxicidad que presentan estos compuestos (44).

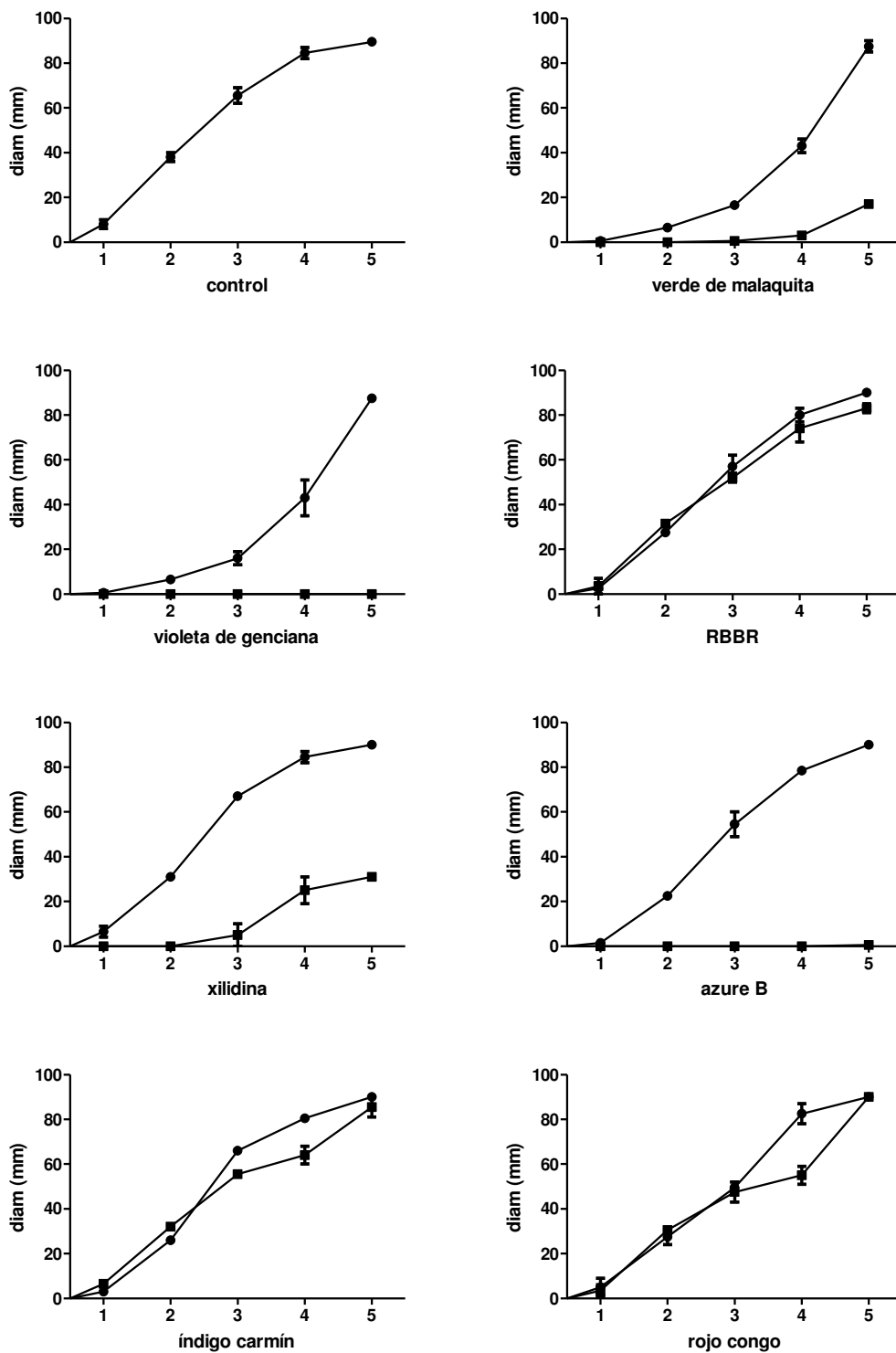


figura 31: curvas de crecimiento y decoloración de la cepa E47 en medio agarizado con los colorantes indicados en cada figura. Se grafica el diámetro de la colonia (círculos) y el diámetro del halo de decoloración (cuadrados).

No se perciben en medio agarizado mayores diferencias entre las cepas ensayadas. Algunos de los colorantes no degradados eficientemente durante el período de tiempo graficado en las figuras 1 y 2 comentaron a ser degradados posteriormente.

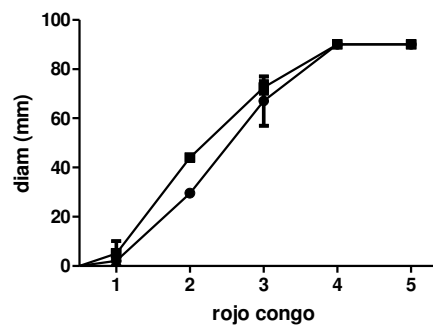
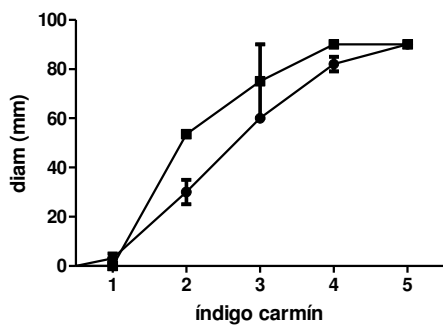
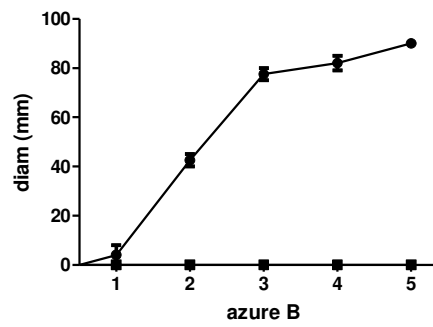
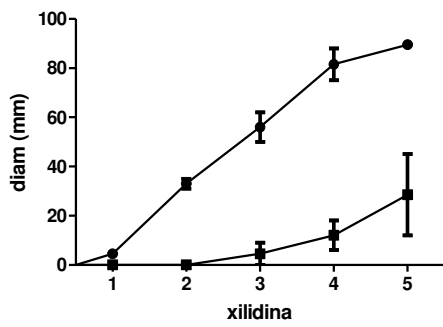
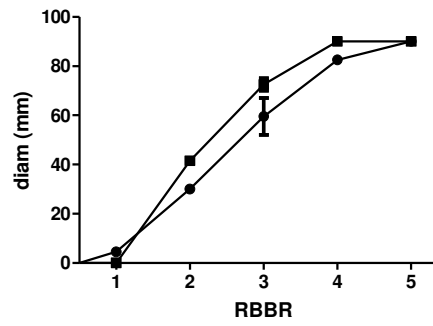
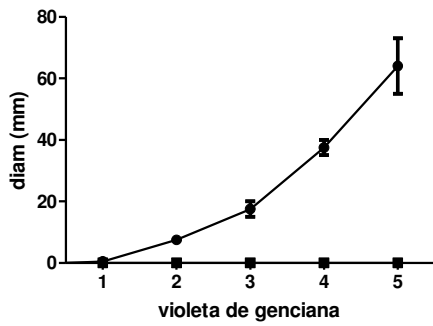
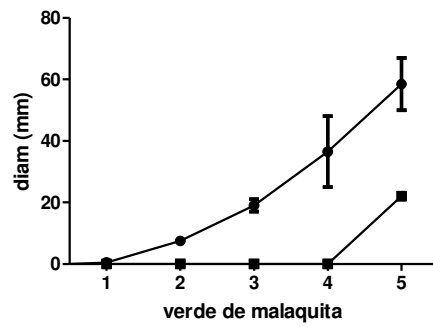
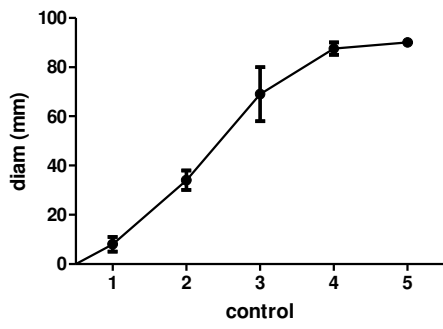


figura 32: : curvas de crecimiento y decoloración de la cepa S en medio agarizado con los colorantes indicados en cada figura. Se grafica el diámetro de la colonia (círculos) y el diámetro del halo de decoloración (cuadrados).

La figura 3 muestra los resultados del screening de colorantes en medio GG agarizados a los siete días de cultivo y al mes debido que en capítulo 1 se demostró la ausencia de actividad lacasa en cultivos jóvenes. Consideramos resultados positivos que muestran una decoloración apreciable en la primera semana, a pesar de que la mayoría de los colorantes fueron degradados luego de un mes.

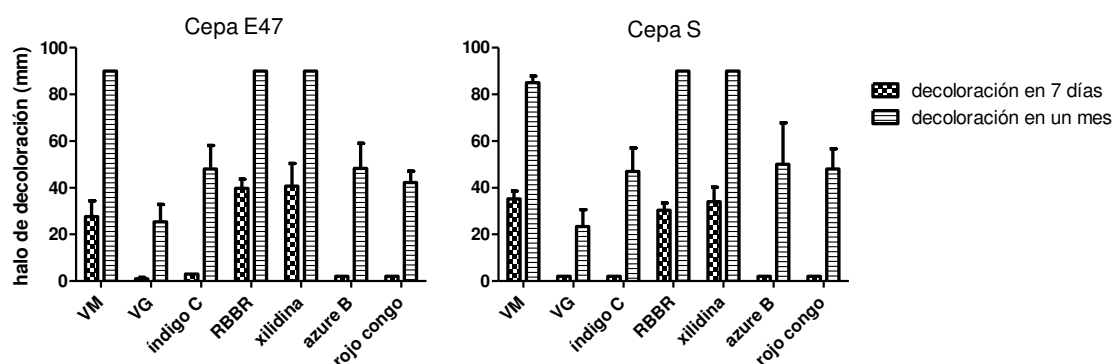


figura 33: decoloración en medio agarizado GG de ambas cepas a los siete días y al mes de cultivo.

### 3.3.2 Ensayos con sobrenadante de cultivo en medio líquido.

El screening de los colorantes decolorizados por los sobrenadantes de cultivos en medio líquido se efectuó con cultivos en medio GG enriquecidos con los siguientes inductores de la actividad enzimática lacasa: Cu (como  $\text{CuSO}_4$ ) 0.25 mM, Mn (como  $\text{MnSO}_4$ ) 0.1 mM, ácido ferúlico 0.1 mM, ácido vainílico 0.1 mM, vainillina 0.1 mM, y cumarina 0.1 mM.

	IC	RBBR	VM	VG	AB	AM	FB	ABF
Control	+	+	-	-	-	-	-	-
Mn	+	+	+	-	-	-	+	+
Cu	+	+	+	+	+	-	+	+
Ferúlico	+	+	+	+	-	-	+	+
Vainílico	+	+	-	-	-	-	-	+
Vainillina	+	+	-	-	-	-	-	+
Cumarina	+	+	-	-	-	-	-	-

**Tabla 7: Screening de inductores de la decoloración en medio líquido con la cepa S. Se utilizaron sobrenadantes de 20 días de cultivo en medio GG estático enriquecidos con los inductores en las concentraciones que se detalla en materiales y métodos. Los colorantes ensayados fueron IC (índigo carmín), RBBR, VM (verde de malaquita), VG (violeta de genciana) AB (azure B), AM (azul de metileno) FB (Fast Blue) y ABF (azul de bromofenol). Los signos + indican decoloración mayor al 10% en 1 hora.**

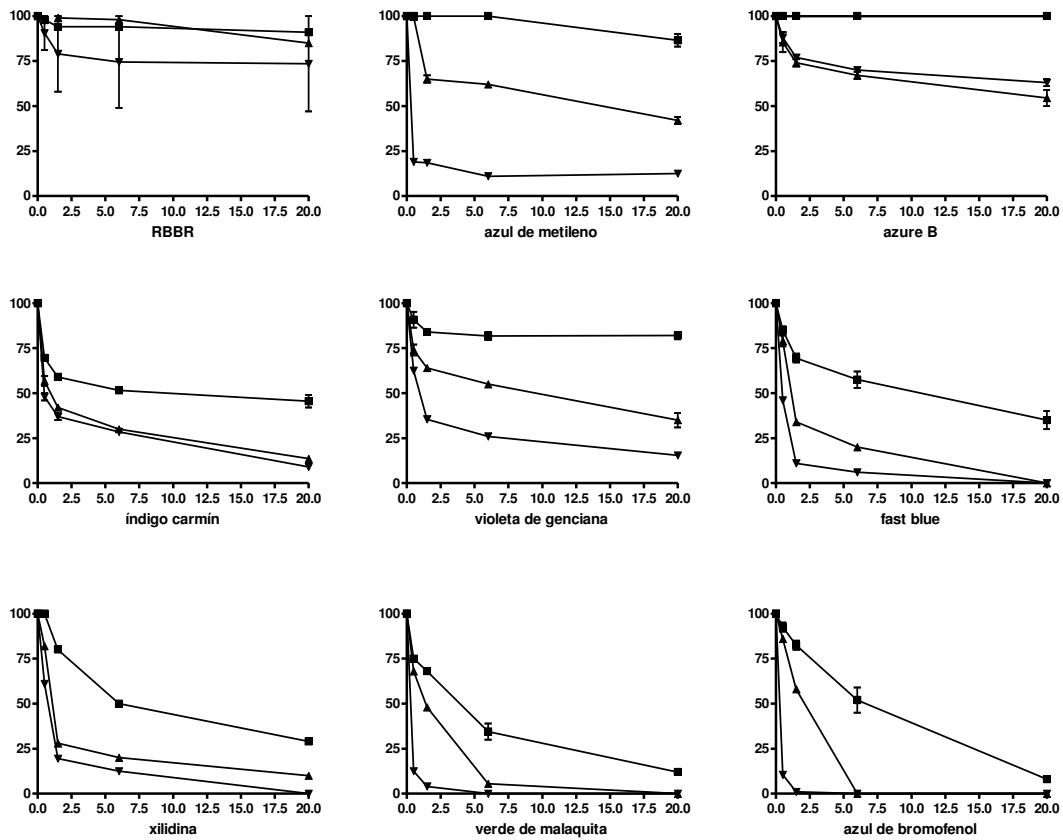
En ambas cepas se observa un patrón semejante de inducción que coincide notablemente con los resultados expuestos en el capítulo 1 para la inducción de la enzima lacasa. Los patrones de degradación de más cantidad de colorantes son los inducidos por cobre y ácido ferúlico. No se observó decoloración apreciable utilizando cultivos de 20 días o menos (datos no se muestran).

	IC	RBBR	VM	VG	AB	AM	FB	ABF
Control	+	+	-	-	-	-	-	-
Mn	+	+	+	-	-	-	+	+
Cu	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferúlico	+	+	+	+	-	-	+	+
Vainílico	+	+	-	-	-	-	+	+
Vainillina	+	-	-	-	-	-	-	+
Cumarina	+	+	-	-	-	-	-	-

**Tabla 2: Screening de inductores de la decoloración en medio líquido de la cepa E47. Se utilizaron sobrenadantes de 20 días de cultivo en medio GG estático enriquecidos con los inductores en las concentraciones que se detalla en materiales y métodos. Los colorantes ensayados fueron IC (índigo carmín), RBBR, VM (verde de malaquita), VG (violeta de genciana) AB (azure B), AM (azul de metileno) FB (Fast Blue) y ABF (azul de bromofenol). Los signos + indican decoloración mayor al 10% en 1 hora.**

Esto, sumado a la escasa actividad de las enzimas Mn peroxidasa y ligning peroxidasa, hace suponer que la lacasa es la responsable principal de la decoloración. Si bien se sabe que la degradación de azure B se utiliza clásicamente como evidencia de actividad Lignin peroxidasa (45), algunas lacasas tienen la capacidad para degradarlo aún sin utilizar mediadores redox (33).

A continuación se realizaron curvas de decoloración a fines de comparar la cinética de este proceso en presencia y ausencia de mediadores de la enzima lacasa. Se utilizaron sobrenadantes provenientes de cultivos inducidos con cobre ( $\text{CuSO}_4$  0.5 mM) debido a lo informado en las tablas 1 y 2 y las conclusiones del capítulo 1. Como mediadores se utilizaron el HBT y el ABTS. Las figuras 4 y 5 muestran las curvas a lo largo de 20 horas.



**figura 34: decoloración por sobrenadantes de cultivos de 25 días inducidos por cobre para la cepa S en presencia y ausencia de los mediadores HBT y ABTS. En el eje de abscisas se informa el tiempo en horas y en las ordenadas el porcentaje de decoloración al que se le restó el control de mediador. Los cuadrados indican la decoloración sin mediadores, los triángulos con vértice hacia arriba representan al HBT y los invertidos el ABTS.**

Se observa un efecto mediador notable en ambas cepas con respecto a todos los colorantes e incluso la capacidad de degradar algunos que en ausencia de mediadores permanecen inalterados tales como el violeta de genciana o el Azure B.



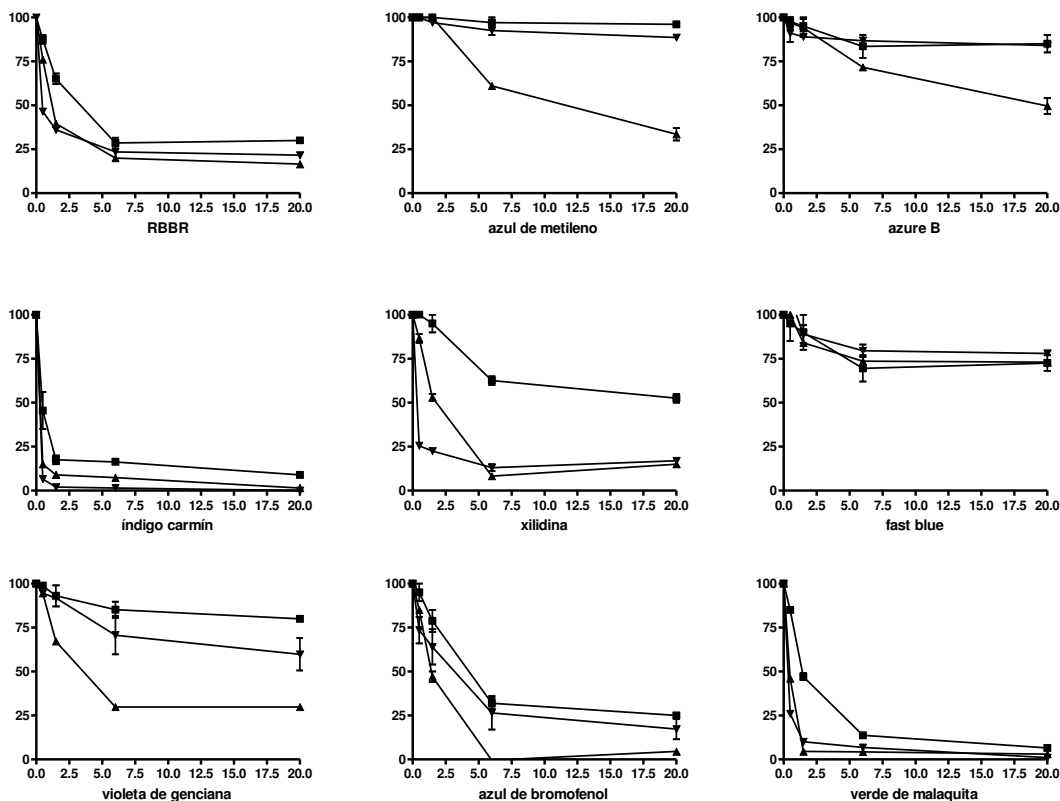


figura 35: decoloración por sobrenadantes de cultivos de 25 días inducidos por cobre para la cepa E47 en presencia y ausencia de los mediadores HBT y ABTS. En el eje de abscisas se informa el tiempo en horas y en las ordenadas el porcentaje de decoloración al que se le restó el control de mediador. Los cuadrados indican la decoloración sin mediadores, los triángulos con vértice hacia arriba representan al HBT y los invertidos el ABTS.

Las diferencias entre ambas copas también son notable en la decoloración de algunos compuestos como el fast blue, pero esto no permite concluir sobre la naturaleza de las enzimas ya que se trata de sobrenadantes complejos que tienen mediadores naturales y distinta composición isoenzimática, como se indica en el capítulo 1.

### 3.3.3 Ensayos con cultivos en medio sólido

Los cultivos detallados en el capítulo 2 en medio sólido fueron comparados en su capacidad para decolorar el colorante verde de malaquita.

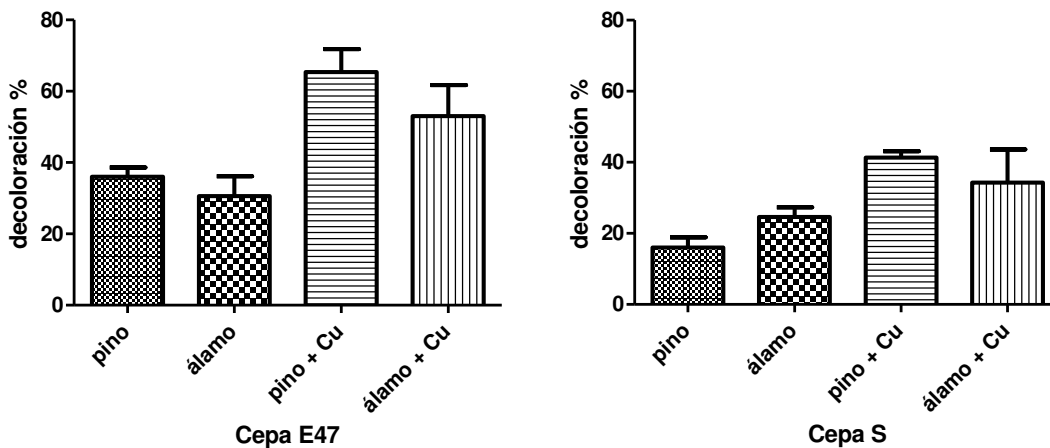
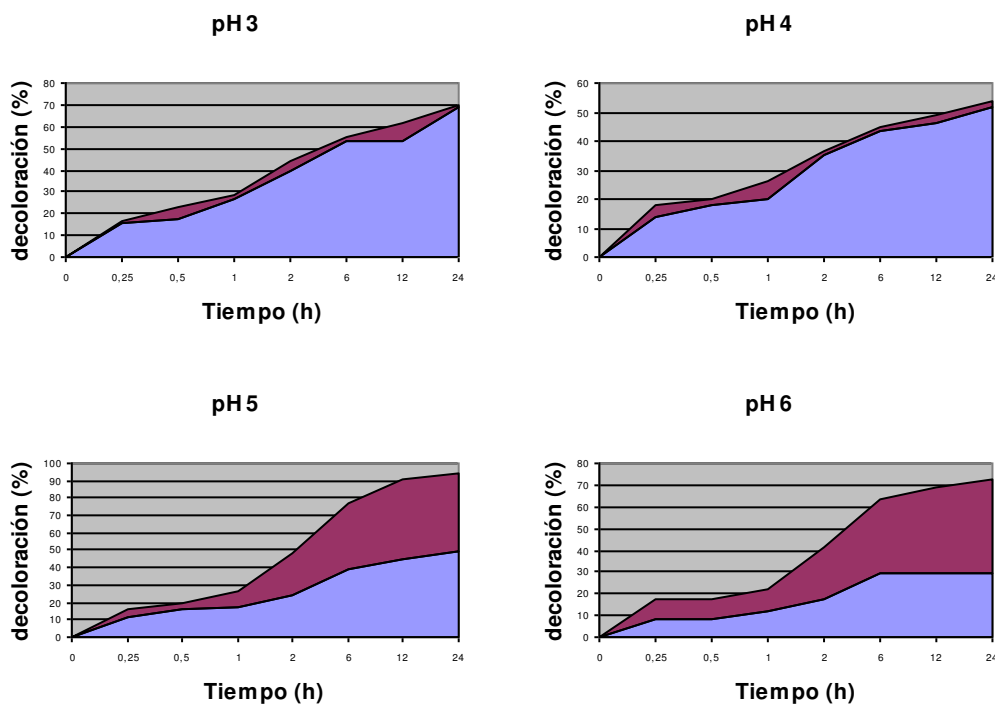


figura 36: decoloración de una solución de colorante verde de malaquita 50  $\mu$ M por el residuo del cultivo sólido (aserrín) de 30 días. La proporción sólido/solución es 1/10 y el tiempo de incubación fue de 5 hs a 22 C. en todos los casos se restó el colorante retenido que se recuperó por elusión en etanol.

En la figura 6 se observa la superioridad de los medios de cultivo sólidos de la cepa E47 en aserrín de pino frente a todos los demás, por lo que se siguió adelante con los ensayos en este medio. Por otra parte no se obtuvieron fructificaciones de la cepa S, por lo que no se siguió adelante con la producción.

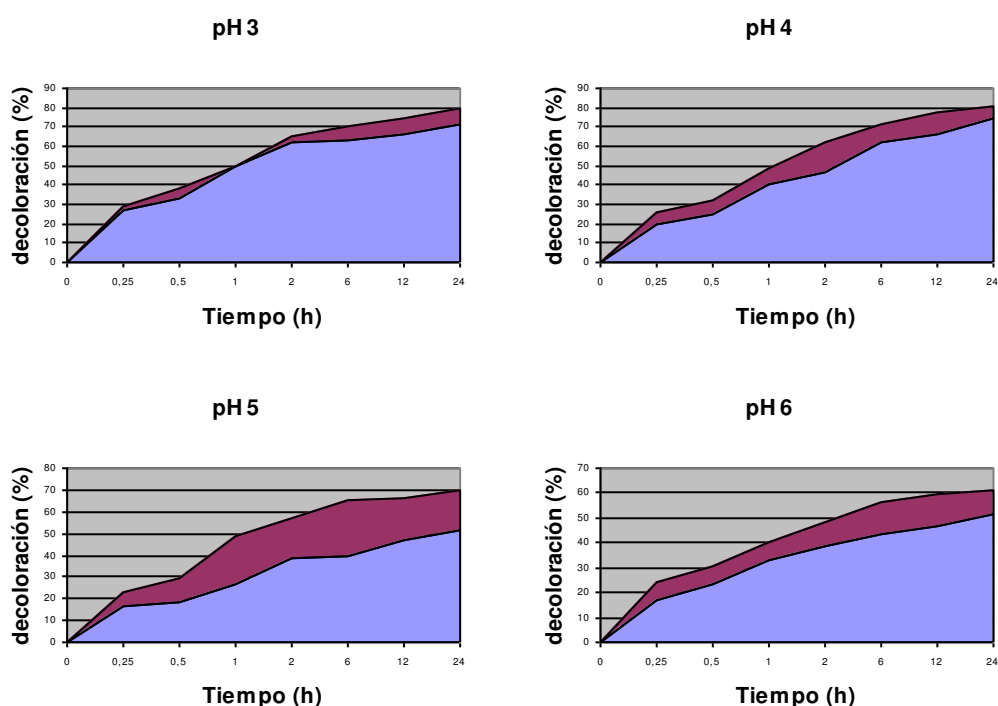
Los ensayos de decoloración con sustrato gastado proveniente de cultivos en medio sólido revelan una importante influencia del fenómeno de adsorción en la

decoloración. Las figuras 7 a 10 muestran la decoloración total en el tiempo por una masa de un gramo de sustrato sólido gastado en 10 ml de solución buffer acetato a ph 3.6 con los colorantes indicados en una concentración inicial de 50  $\mu$ M. La parte inferior del área es la que indica la decoloración en presencia de azida sódica 0.5% en la mezcla a decolorar, a fines de inhibir la actividad enzimática (46) y cuantificar solamente la adsorción del colorante tanto al micelio como a al sustrato lignocelulósico. El trazo superior es el correspondiente a la decoloración total y la diferencia indicada en otro color equivale a la degradación enzimática. En todos los casos es mayor la adsorción que la degradación a la concentración ensayada. En la figura 7 se muestra la decoloración del colorante índigo carmín, pudiendo observarse una diferencia en favor de la degradación para pH's altos.



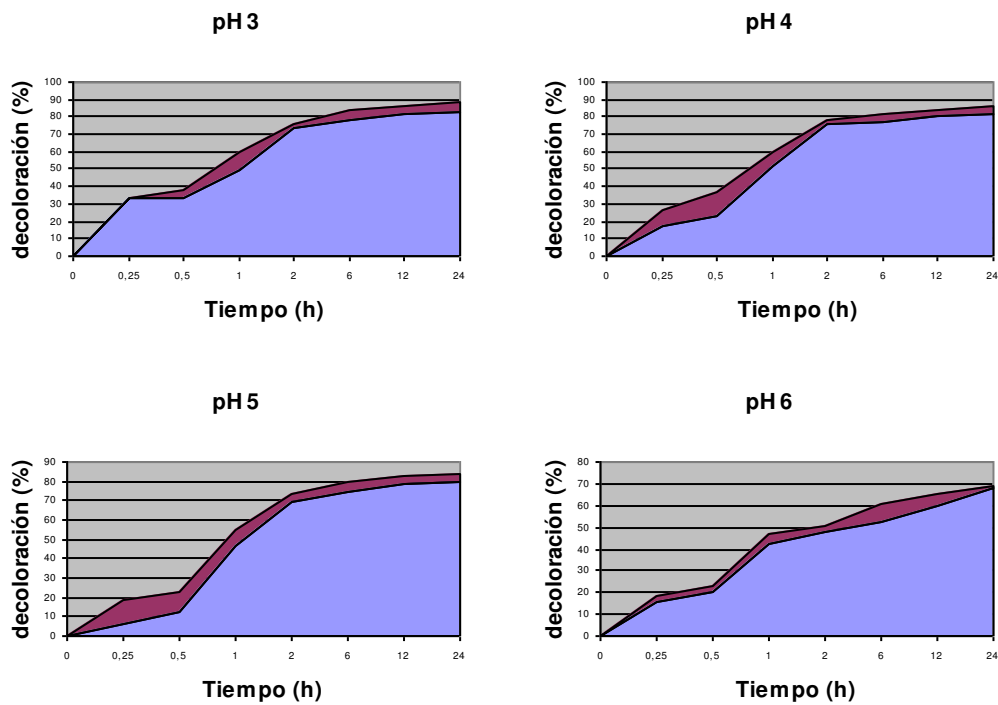
**figura 37: decoloración del colorante índigo carmín por medio sólido gastado (aserrín + Cu 10mM) de 30 días de cultivo. El área púrpura indicial a decoloración por degradación mientras que el area violeta inferior representa la adsorción.**

De todos modos, se trata de un colorante natural (actualmente producido sintéticamente) fácilmente degradable (21, 47) incluso por bacterias (48), por lo que cabe la posibilidad de que haya degradación por algún sistema oxidativo resistente a la azida.



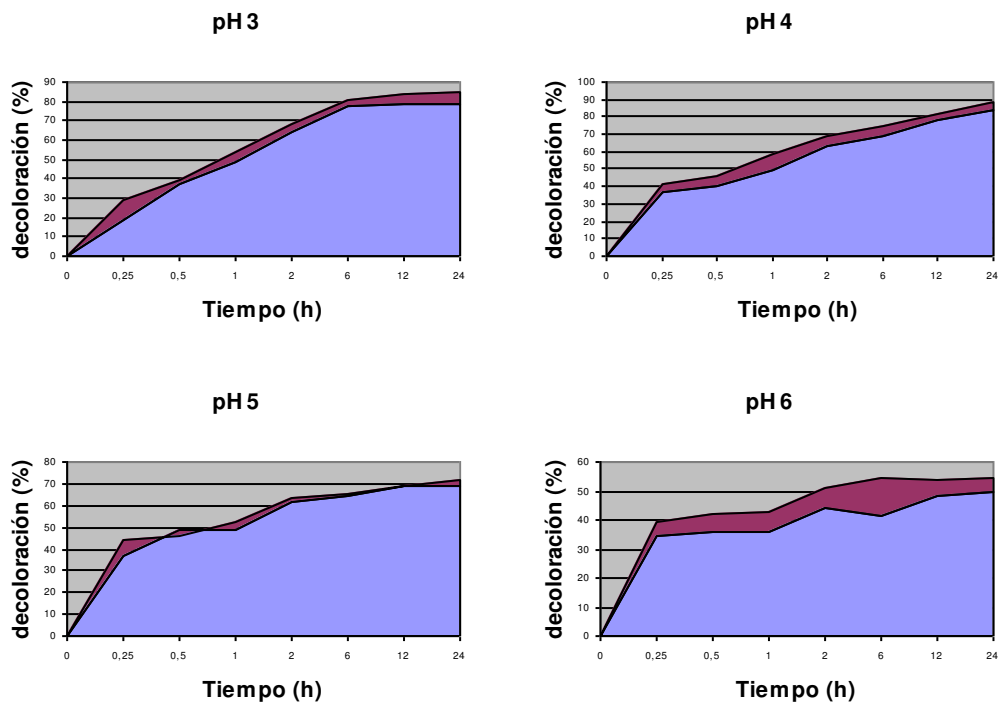
**figura 38: decoloración del colorante RBBR por medio sólido gastado (aserrín + Cu 10mM) de 30 días de cultivo. El área púrpura indica a decoloración por degradación mientras que el area violeta inferior representa la adsorción.**

La decoloración del colorante RBBR se muestra en la figura 8, con un máximo de degradación enzimática a pH 5. La degradación de este colorante es en todos los casos superior al verde de malaquita y violeta de genciana que por su estructura son más recalcitrantes.



**figura 39: decoloración del colorante verde de malaquita por medio sólido gastado (aserrín + Cu 10mM) de 30 días de cultivo. El área púrpura indica a decoloración por degradación mientras que el área violeta inferior representa la adsorción.**

La figura 9 muestra la decoloración del colorante verde de malaquita en función del tiempo. No se observan variaciones a distintos pH.



**figura 40: decoloración del colorante violeta de genciana por medio sólido gastado (aserrín + Cu 10mM) de 30 días de cultivo. El área púrpura indicial a decoloración por degradación mientras que el area violeta inferior representa la adsorción.**

La figura 10 muestra la decoloración del violeta de genciana. El patrón es semejante al del verde de malaquita. Se observa mayor decoloración por parte del medio sólido que en el ensayo preliminar en medio agarizado. También es superior el resultado al obtenido con sobrenadante de medios líquidos, probablemente debido a la presencia de mediadores naturales en el residuo de aserrín.

Se probó la decoloración con extracto de medio sólido en buffer acetato pH 3.6 en relación 1/5 durante 10 minutos de agitación. Se utilizaron como mediadores el HBT y el ABTS como se indica en materiales y métodos. En las figuras 11 y 12 se muestran los resultados de la decoloración a lo largo de 20 hs.

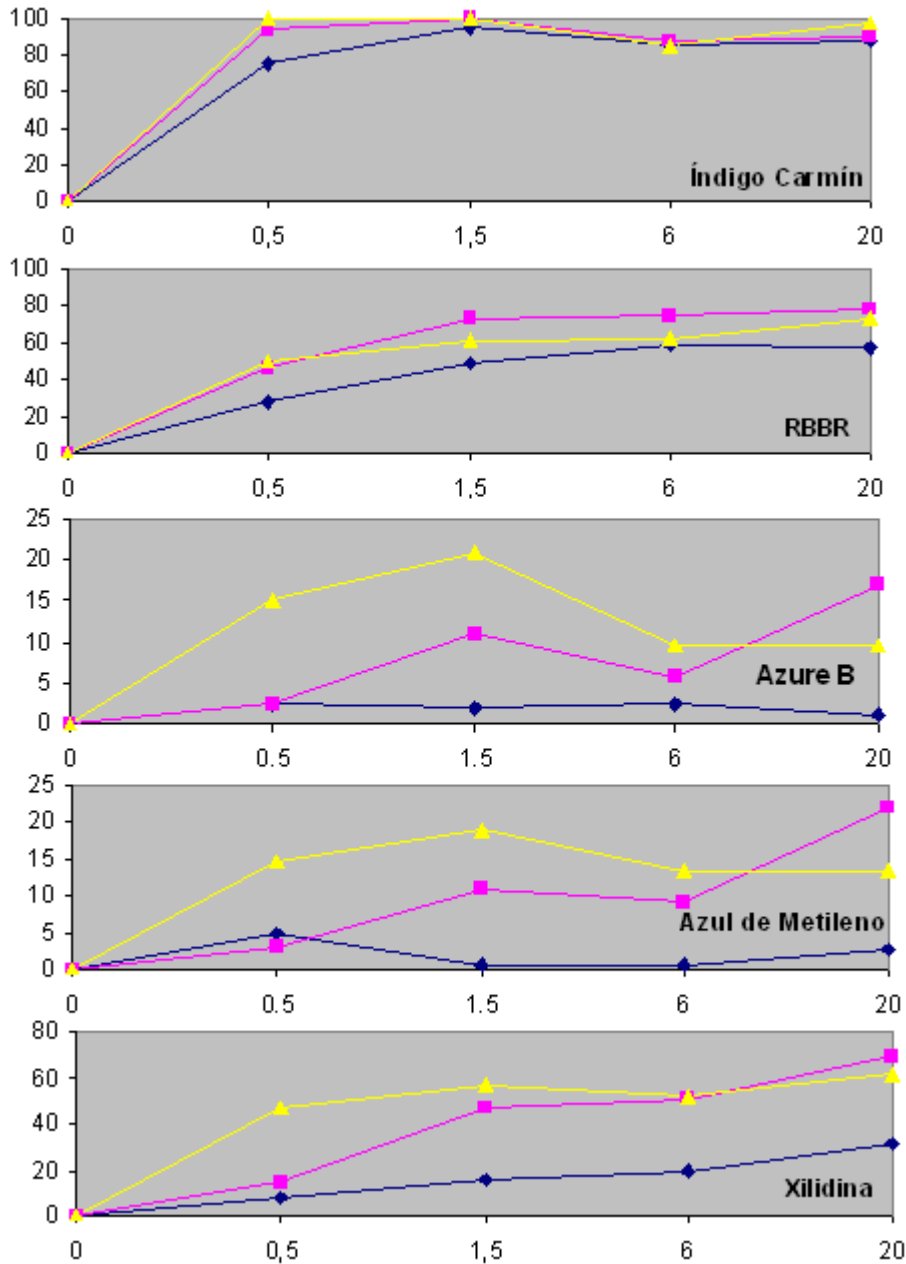


figura 41: efecto de los mediadores redox de la lacasa en las curvas de decoloración en los colorantes índigo carmín, RBBR, azure B, azul de metileno y xilidina. en el eje de las abcisas se representa el tiempo en horas y en las ordenadas el porcentaje de decoloración. Los rombos corresponden al control, los cuadrados al ABTS y los triángulos al HBT.

Se observa en general una decoloración mayor que en los medios líquidos cuando no se

utilizan mediadores. Como se indicó en la experiencia anterior, esto se debe probablemente a la presencia de mediadores naturales en el medio sólido natural.

Este efecto es notable en particular en colorantes de degradación más difícil como el violeta de genciana o el azure B.

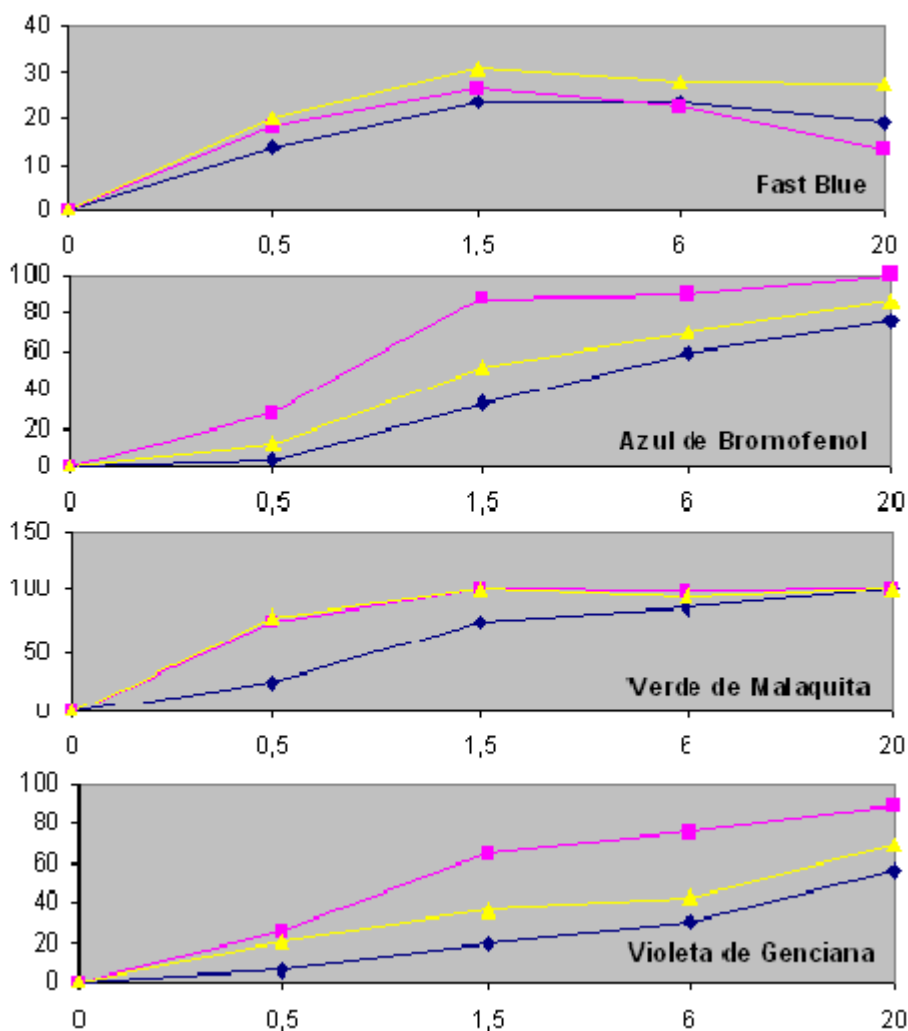
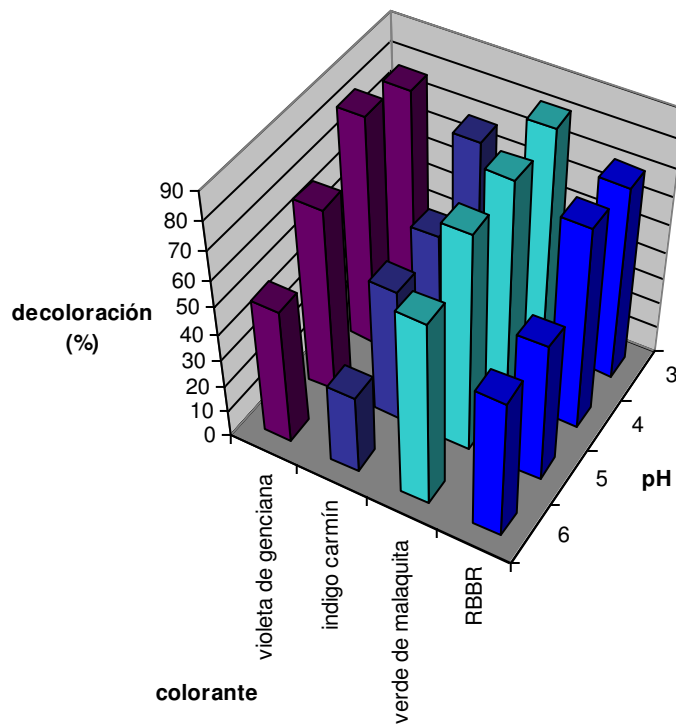


figura 42: efecto de los mediadores redox de la lacasa en las curvas de decoloración en los colorantes fast blue, azul de bromofenol, verde de malaquita y violeta de genciana. en el eje de las abcisas se representa el tiempo en horas y en las ordenadas el porcentaje de decoloración.

En ambas figuras se observa que en algunos casos la coloración vuelve a aumentar. esto ocurre probablemente debido a que el extracto de un medio complejo como es el aserrín contiene muchas sustancias fenólicas que interactúan con las enzimas dando compuestos pardos.





**figura 43: Dependencia de la deoloración por adsorción con respecto al pH de cuatro colorantes por parte del medio gastado (pino + Cu 10 mM) de 30 días de cultivo.**

En la figura 13 se muestra la dependencia del pH de la decoloración por adsorción del medio gastado. Se trata de una interacción compleja que depende de las macromoléculas involucradas en el proceso y su dependencia con el pH no es clara, aunque la figura muestra una clara tendencia al incremento de la adsorción en pH's bajos.

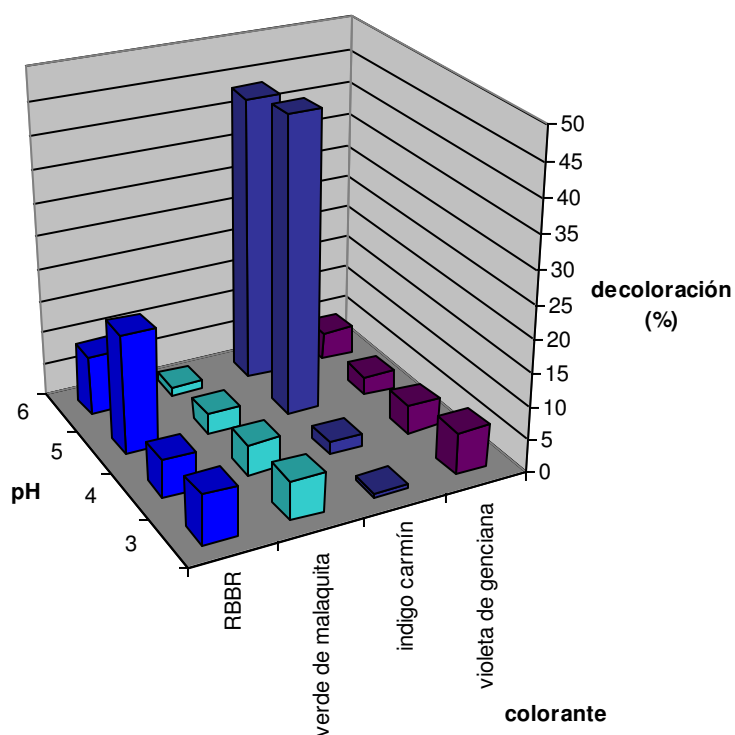


figura 44: Dependencia de la decoloración por degradación con respecto al pH de cuatro colorantes por parte del medio gastado (pino + Cu 10 mM) de 30 días de cultivo.

La figura 13 muestra la dependencia del pH de la decoloración por degradación de algunos colorantes por parte del medio sólido gastado. En los casos del verde de malaquita y el violeta de genciana, de difícil degradación, se observa una mayor degradación a pH's bajos, coincidente con la actividad de la enzima lacasa. En los casos de los colorantes de fácil degradación como el RBBR y el índigo carmín esta dependencia se invierte, sugiriendo que pueden actuar sistemas independientes de la lacasa en la degradación.

### 3.3.4 Ensayo de detoxificación

Dado que se obtuvo una buena degradación del colorante verde de malaquita, cuya toxicidad es reconocida, se procedió a testear la toxicidad remanente de la solución

decolorado en un bioensayo con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, altamente sensible a este colorante.

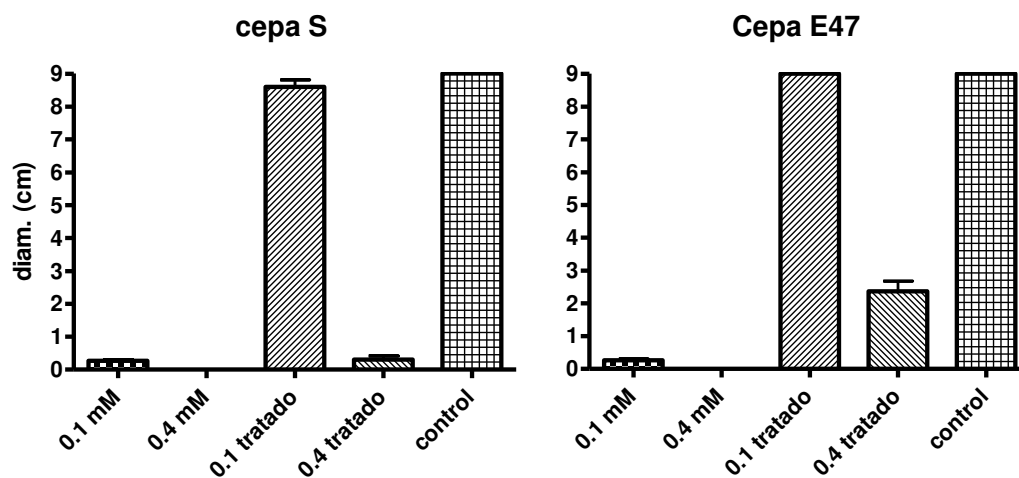


figura 45: crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* como indicador de detoxificación de soluciones de 0.1 y 0.4 mM de verde de malaquita tratado con sobrenadante de cultivo de ambas cepas de *G. lucidum*. El tiempo de cultivo fue de 5 días en medio GG con 5% de la solución decolorada.

La figura 15 muestra la detoxificación producida por la decoloración utilizando sobrenadantes de cultivos en medio líquido en presencia de cobre. Las soluciones de 0.1 mM de verde de malaquita fueron completamente detoxificadas por ambas cepas, mientras que la concentración de 0.4 mM sólo fue parcialmente detoxificada por la cepa E47 y prácticamente no detoxificada por S.

### **3.4 discusión**

La cepa E47 ha mostrado mayor capacidad de decoloración en medios sólidos y una mayor detoxificación utilizando sobrenadantes de medios líquidos. Ambas cepas muestran notable capacidad para decolorar los colorante RBBR, rojo congo, xilidina, índigo carmín, verde de malaquita, pero son poco capaces de decolorar el azul de metileno y el azure B. La decoloración parcial del azure B ocurre a pesar de la ausencia de lignin peroxidasa indicada en el capítulo 1 se debe tal vez a la acción de la lacasa como lo demuestran otros trabajos (49) y es incrementada por la presencia de mediadores. La acción de los mediadores es comparable con la verificada en la bibliografía para otros hongos de pudrición blanca (32, 50, 51) y la mayor degradación obtenida con medios sólidos se debe probablemente a la acción de los mediadores naturales que se conoce y está reportada en otras especies (6, 52-55) para la decoloración de colorantes textiles y otros compuestos, como así también para el bioblanqueado de pasta de papel. Para *G. lucidum* se ha reportado la superioridad de los mediadores naturales en este hongo con respecto, por ejemplo al HBT, que explicaría la eficiencia de la decoloración obtenida en el presente trabajo con medios naturales.

La dependencia del pH en la adsorción se discute en particular en el capítulo 4, pero la dependencia con respecto a la decoloración parece seguir la esperada para la enzima lacasa en los colorantes trifenilmetanos, mientras que en el RBBR y el índigo carmín aparece una relación inversa probablemente debido a otros sistemas de decoloración presentes en los medios de cultivo gastados.

La inducción de la decoloración por metales pesados había sido estudiada en *Ganoderma lucidum*, con resultados similares. Murguesan (35) reporta una mayor decoloración en presencia de  $\text{Cu}^{++}$  y otros metales y resalta la capacidad de *Ganoderma* de tolerarlos en crecimiento, lo que coincide con los resultados obtenidos en el capítulo 1.

La actividad inductora de los compuestos fenólicos que ya fue resaltada en el capítulo 1 con respecto a la actividad lacasa ha sido verificada en trabajos

anteriores (41) y coincide con los resultados obtenidos aquí, en especial para el ácido ferúlico.

La verificación de muchos de estos resultados en ambas cepas permite sortear el obstáculo que implica la heterogeneidad taxonómica del complejo de especies que se conoce como *G. lucidum*, ya que respalda los resultados in limitarse a un aislamiento del género que podría no ser representativo del resto. Aún así es difícil establecer comparaciones con los datos encontrados en la bibliografía ya que no se puede saber exactamente la amplitud y variabilidad de lo que llamamos *G. lucidum*.

Los datos expuesto aquí y en el capítulo 4 sobre adsorción de contaminantes al micelio permiten concluir que *G. lucidum* presenta un potencial notable para ser utilizado en la biorremediación de compuestos colorantes textiles en diversas formas de cultivo. Esto, junto con su capacidad de crecer tolerando altos niveles de contaminación, abre las puertas a futuros ensayos a gran escala para aplicar estos métodos a efluentes reales en condiciones industriales.

## Referencias

1. A. K. Haritash, C. P. Kaushik, *J. Hazard. Mater.* **169**, 1 (2009).
2. W. Liu, Y. Chao, X. Yang, H. Bao, S. Qian, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 127 (2004).
3. T. Robinson, B. Chandran, P. Nigam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 810 (2001).
4. V. Faraco, C. Pezzella, A. Miele, P. Giardina, G. Sannia, *Biodegradation.* **20**, 209 (2009).
5. R. Khlifi *et al.*, *J. Hazard. Mater.* **175**, 802 (2010).
6. R. Khlifi-Slama, T. Mechichi, S. Sayadi, A. Dhouib, *J. Microbiol.* **50**, 226 (2012).
7. S. Mendes *et al.*, *Bioresour. Technol.* **102**, 9852 (2011).
8. S. Vanhulle *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* **42**, 584 (2008).
9. D. Ryan, W. Leukes, S. Burton, *Bioresour. Technol.* **98**, 579 (2007).
10. A. Jaouani, M. G. Tabka, M. J. Penninckx, *Chemosphere* **62**, 1421 (2006).
11. P. Chairattanamakorn, T. Imai, R. Kondo, M. Ukita, P. Prasertsan, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **128**, 195 (2006).
12. D. Kalpana *et al.*, *J. Environ. Manage.* **111C**, 142 (2012).
13. C. Deivasigamani, N. Das, *Biodegradation.* **22**, 1169 (2011).
14. V. V. Dawkar, U. U. Jadhav, S. U. Jadhav, S. P. Govindwar, *J. Appl. Microbiol.* **105**, 14 (2008).
15. C. A. Hsu *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* **46**, 5109 (2012).
16. R. C. Senan, T. E. Abraham, *Biodegradation.* **15**, 275 (2004).
17. J. P. Jadhav, S. P. Govindwar, *Yeast* **23**, 315 (2006).
18. A. Kunz, V. Reginatto, N. Duran, *Chemosphere* **44**, 281 (2001).
19. M. A. Martins, N. Lima, A. J. Silvestre, M. J. Queiroz, *Chemosphere* **52**, 967 (2003).
20. P. Dayaram, D. Dasgupta, *J. Environ. Biol.* **29**, 831 (2008).

21. M. Ramya, B. Anusha, S. Kalavathy, *Biodegradation*. **19**, 283 (2008).
22. C. H. Niebisch *et al.*, *J. Hazard. Mater.* **180**, 316 (2010).
23. L. Casieri *et al.*, *Folia Microbiol. (Praha)* **53**, 44 (2008).
24. P. Baldrian, *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215 (2006).
25. E. Rodriguez, M. A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, *Curr. Microbiol.* **38**, 27 (1999).
26. M. A. Ullah, H. Kadhim, R. A. Rastall, C. S. Evans, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 832 (2000).
27. M. Asgher, H. N. Bhatti, M. Ashraf, R. L. Legge, *Biodegradation*. **19**, 771 (2008).
28. M. R. Hu, Y. P. Chao, G. Q. Zhang, Z. Q. Xue, S. Qian, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 45 (2009).
29. K. Mueangtoom, R. Kittl, O. Mann, D. Haltrich, R. Ludwig, *Biotechnol. J.* **5**, 857 (2010).
30. H. N. Bhatti, N. Akram, M. Asgher, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **149**, 255 (2008).
31. I. Ciullini, S. Tilli, A. Scozzafava, F. Briganti, *Bioresour. Technol.* **99**, 7003 (2008).
32. S. Camarero, D. Ibarra, M. J. Martinez, A. T. Martinez, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1775 (2005).
33. E. Grassi, P. Scodeller, N. Filiel, R. Carballo, L. Levin, *International Biodeterioration & Biodegradation* (2011).
34. J. P. Jadhav, G. K. Parshetti, S. D. Kalme, S. P. Govindwar, *Chemosphere* **68**, 394 (2007).
35. K. Murugesan, Y. M. Kim, J. R. Jeon, Y. S. Chang, *J. Hazard. Mater.* **168**, 523 (2009).
36. N. Hatvani, I. Mecs, *Ecotoxicol. Environ. Saf* **55**, 199 (2003).
37. M. S. Haddadin, R. Al-Natour, S. Al-Qsous, R. K. Robinson, *Bioresour. Technol.* **82**, 131 (2002).
38. R. T. Mendonca, J. F. Jara, V. Gonzalez, J. P. Elissetche, J. Freer, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1323 (2008).

39. K. Perumal, K. Murugesan, P. T. Kalaichelvan, *Indian J. Exp. Biol.* **38**, 385 (2000).
40. R. Zhuo *et al.*, *J. Hazard. Mater.* **192**, 855 (2011).
41. K. Murugesan, I. H. Yang, Y. M. Kim, J. R. Jeon, Y. S. Chang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 341 (2009).
42. C. J. da Silva *et al.*, *Curr. Microbiol.* **60**, 350 (2010).
43. J. R. Jeon, K. Murugesan, Y. M. Kim, E. J. Kim, Y. S. Chang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 783 (2008).
44. D. K. Bakshi, P. Sharma, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **22**, 101 (2003).
45. F. S. Archibald, *Applied and environmental microbiology* **58**, 3110 (1992).
46. P. Baldrian, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 560 (2004).
47. L. Levin, L. Papinutti, F. Forchiassin, *Bioresour. Technol.* **94**, 169 (2004).
48. E. A. Cho, J. Seo, D. W. Lee, J. G. Pan, *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 100 (2011).
49. E. Grassi, P. Scodeller, N. Filiel, R. Carballo, L. Levin, *International Biodeterioration & Biodegradation* **65**, 635 (2011).
50. M. T. Cambria, Z. Minniti, V. Librando, A. Cambria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **149**, 1 (2008).
51. C. S. Rodriguez, M. Sanroman, G. M. Gubitz, *Chemosphere* **58**, 417 (2005).
52. A. G. Barneto, E. Aracri, G. Andreu, T. Vidal, *Bioresour. Technol.* **112**, 327 (2012).
53. C. Johannes, A. Majcherczyk, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 524 (2000).
54. A. Fillat, J. F. Colom, T. Vidal, *Bioresour. Technol.* **101**, 4104 (2010).
55. A. Gutierrez *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4124 (2007).



## Capítulo 4: Efecto de los vainilloides en la resistencia a estrés químico.

### 4.1 Introducción.

En el capítulo 3 se analizaron algunos aspectos de la degradación de colorantes por parte de *Ganoderma lucidum*. Algunos de estos compuestos, como los colorantes de la familia de los trifenilmetanos, son inhibidores conocidos del crecimiento fúngico, al punto de que fueron utilizados tradicionalmente como antimicóticos en humanos y en animales. Es conocida desde hace mucho tiempo la inducción que ejercen muchos compuestos aromáticos en la síntesis de lacasa por parte de hongos (1, 2) que es una de las enzimas responsables de la detoxificación. Paszczyński et al. (3) reportan un incremento en la degradación enzimática de los colorantes azóicos sustituidos con guayacol. Además de estimular la degradación, algunos compuestos aromáticos funcionan como antioxidantes en otros organismos, por lo que podrían evitar el estrés oxidativo producido por diversas toxinas.

Además de estudiar las capacidades degradativas de los compuestos con miras a la biorremediación, es importante también considerar la capacidad del organismo en cuestión de tolerar las condiciones adversas del medio contaminado.

Además de la capacidad de degradar compuestos tóxicos, otros mecanismos que permiten la vida de los hongos en condiciones de estrés químico involucran la adsorción o secuestro extracelular de los estresores.

Uno de los fenómenos más estudiados a este respecto es la biosorción, esto es; la capacidad de los organismos vivos para retirar xenobióticos del ambiente o de determinados fluidos sin que ello implique la degradación de los mismos (4, 5). En particular los hongos han sido objeto de atención debido a su capacidad de producir biomasa capaz de adsorber contaminantes (6-8) tales como metales

pesados (6, 7, 9-11) o hasta núclidos radioactivos (12-15) para su depósitos final o su recuperación y reutilización.

Si bien la regulación de la producción y actividades enzimáticas relacionadas con la biodegradación han sido extensamente investigadas y revisadas (16-21), la biosorción es un campo menos explorado. Se han optimizado procesos de este tipo a través del control de factores tales como el pH (22), algunos aspectos nutricionales (23) y otros factores (8) pero no hay estudios acerca de una posible regulación de esta capacidad por compuestos aromáticos.

El objetivo del presente es estudiar la tolerancia inespecífica a diversos tóxicos inducida por algunos compuestos fenólicos.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Cepas de hongos y condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa E47 de *G. lucidum* (Universidad de Guelph, Guelph, Canadá). Los cultivos se mantuvieron en medio MEA (extracto de malta 1,2%, glucosa al 1%, agar al 2%) a 4 ° C. El inóculo consistió en un explanto de agar 25-mm<sup>2</sup> superficie de un cultivo de 12-días de edad cultivadas en MEA. Los medios definidos (GG) conteniendo: MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6 g; CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O, 0,4 mg; MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O, 0,09 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,07 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O, 0,02 mg ; FeCl<sub>3</sub>, 1 mg; ZnCl<sub>2</sub>, 3,5 mg; clorhidrato de tiamina, 0,1 mg; ácido glutámico, 9 g; glucosa 10 g, y agua destilada hasta 1 L, pH se ajustó a 6,0. GG medio sólido contenía agar 20 g L<sup>-1</sup>. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml que contienen 50 ml de medio a 28 ° C. Todos los productos químicos empleados fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación adicional.

### **4.2.2. Screening de compuestos aromáticos en placas de agar.**

Se probó el Efecto de diversos compuestos aromáticos en el crecimiento de *G. lucidum* en presencia de alta concentración del colorante fungicida violeta de genciana (GV). Para el screening del efecto protector de los compuestos aromáticos, el hongo se inoculó en placas que contenían 20 ml de GG agarizado suplementado con 50 mM GV y compuestos aromáticos de diferente estructura química: cuatro derivados de guayacol (vainilloides): guayacol (1 mM), ácido ferúlico ( 1 mM), ácido vainílico (VA; 1 mM), vainillina (0,5 mM), y ocho compuestos aromáticos no relacionados con guayacol: resorcinol (1 mM), la cumarina (0,5 mM), difenilamina (0,1 mM), anisaldehído (1 mM) , anisol (1 mM), timol (1 mM), ácido hidroxibenzoico (HBA; 1 mM), y 1-hidroxibenzotriazol (HBT; 1

mM). Placas sin GV se usaron como control. Crecimiento radial se midió en dos direcciones perpendiculares desde el borde del inóculo al margen de avance de la colonia.

#### **4.2.3 Ensayos de toxicidad en las placas de agar.**

Con el fin de determinar el efecto de la concentración de VA en el efecto protector, las placas que contienen GG agarizado y diferentes concentraciones de VA (de 0,1 mM a 10 mM) fueron inoculadas con el hongo y el crecimiento radial se midió diariamente. Los factores de estrés químicos fueron evaluados como antes en medios agarizados con o sin ácido vainílico. Las siguientes sustancias tóxicas fueron ensayadas: GV 50  $\mu$ m, 50  $\mu$ m, verde de malaquita, clotrimazol 25 mg mL<sup>-1</sup>, nistatina, arsénico y cadmio en las concentraciones indicadas en cada caso de los resultados.

#### **4.2.4 Ensayos en medio líquido**

Los cultivos de *G. lucidum* se realizaron en Erlenmayer de 250 ml que contenían 50 ml de medio de GG a 28 ° C. La capacidad de crecimiento de los hongos en la presencia de GV, clotrimazol y VA se evaluó obteniendo el Peso seco periódicamente para la estimación de crecimiento.

Material extracelular mucilaginoso (ECMM) se separó de los cultivos líquidos mediante centrifugación a 3.000 'g 10 min. Después de la eliminación de la ECMM de micelio, se resuspendieron en agua destilada y se centrifugó de nuevo a 3.000 'g 10 min con el fin de lavar el medio de cultivo restante.

#### **4.2.5 Ensayos de adsorción**

Violeta de Genciana se obtuvo de Sigma (St. Louis, EE.UU.), y se usó sin purificación adicional. Solución madre de colorante se preparó usando GV en agua bidestilada. La adsorción de GV (0 a 130 mM) se midió en un sistema por lotes para obtener datos de velocidad y equilibrio. Se midieron Los efectos de las concentraciones iniciales, tiempo de contacto y el pH del medio en la velocidad de adsorción y la capacidad. El pH de los medios de comunicación se ajustó en un rango de 4-7 usando buffer acetato (10 mM de concentración final). El pH de las soluciones se midió con un medidor de pH (HI 9321, Hanna Instruments). La adsorción de la GV a los micelios y ECMM se controló espectrofotométricamente a 584 nm de la solución acuosa y los valores se expresaron como  $100/A_0$  En donde: A = absorbancia en el tiempo t y  $A_0$  = absorbancia en el tiempo 0. Concentraciones de violeta de genciana ( $\text{mg L}^{-1}$ ) se correlacionaron con los valores de absorbancia. Un matraz de control conteniendo sólo agua destilada y ECMM se utilizó para determinar la absorbancia nivel cero. Alícuotas de los sobrenadantes se recogieron a intervalos de tiempo predeterminados para determinar la concentración residual de colorante en la solución. Antes del análisis, las muestras se centrifugaron a  $3.000 \text{ 'g}$  durante 5 min, y la absorbancia del sobrenadante se midió. El violeta de genciana adsorbido por la biomasa se calculó en referencia al equilibrio.

#### **4.2.6 Estudios cinéticos**

Debido a su carácter empírico y aplicabilidad en sistemas heterogéneos, el modelo de la ecuación de Freundlich fue utilizado para describir las isothermas de adsorción de GV de micelio. Ecuación de Freundlich:  $q_e = A C_e^{1/b}$ , donde  $q_e$  es la capacidad de absorción de adsorbato (GV  $\text{mg g}^{-1}$  de micelio seco);  $C_e$  es la concentración de equilibrio de GV en solución después de el ensayo de adsorción ( $\text{mg L}^{-1}$ ); A y b son las constantes de Freundlich a estimar, siendo A la capacidad

máxima de absorción de adsorbato y b la afinidad de adsorción constante. Para representar gráficamente las isothermas  $q_e$  versus  $C_{eq}$ , el tiempo de contacto y valores de pH fueron seleccionados sobre la base del experimento anterior. Debido al hecho de que las intensidades de color de GV dependen del pH, la concentración de fungicida en el medio acuoso se calculó a partir de curvas de calibración a diferentes valores de pH. Puntos de datos experimentales se obtiene manteniendo constante la masa de micelio en 1 g y variando la concentración del fungicida 0 a 130 mM g<sup>-1</sup>. La capacidad de adsorción de GV se calculó a partir de la concentración inicial en el medio acuoso. Las constantes fueron calculadas por regresión no lineal utilizando STATISTICA 5,1 (StatSoft, Tulsa, OK).

#### **4.2.7 Determinación de cadmio**

Preparación de los sobrenadantes de cultivo de hongos de biomasa y para la determinación de Cd: la biomasa seca en el rango de 30-100 mg y los sobrenadantes se sometieron a digestión con ácido nítrico y ácido sulfúrico (1:1 [vol / vol]). Digestión completa se obtuvo después de que las muestras se incubaron 1 hora a 60 ° C. Las muestras digeridas se sonicaron (90 min a 60 ° C) se mezclaron con 5% (vol / vol) Triton X-100 y suplementado con itrio (Y) y estroncio (Sr) como referencia. La concentración de Cd en las muestras (mg Cd g<sup>-1</sup>) se midió con el método de acoplado inductivamente espectrometría de emisión de plasma óptico en la línea analítica 214,440 nm.

#### **4.2.8 Los análisis estadísticos**

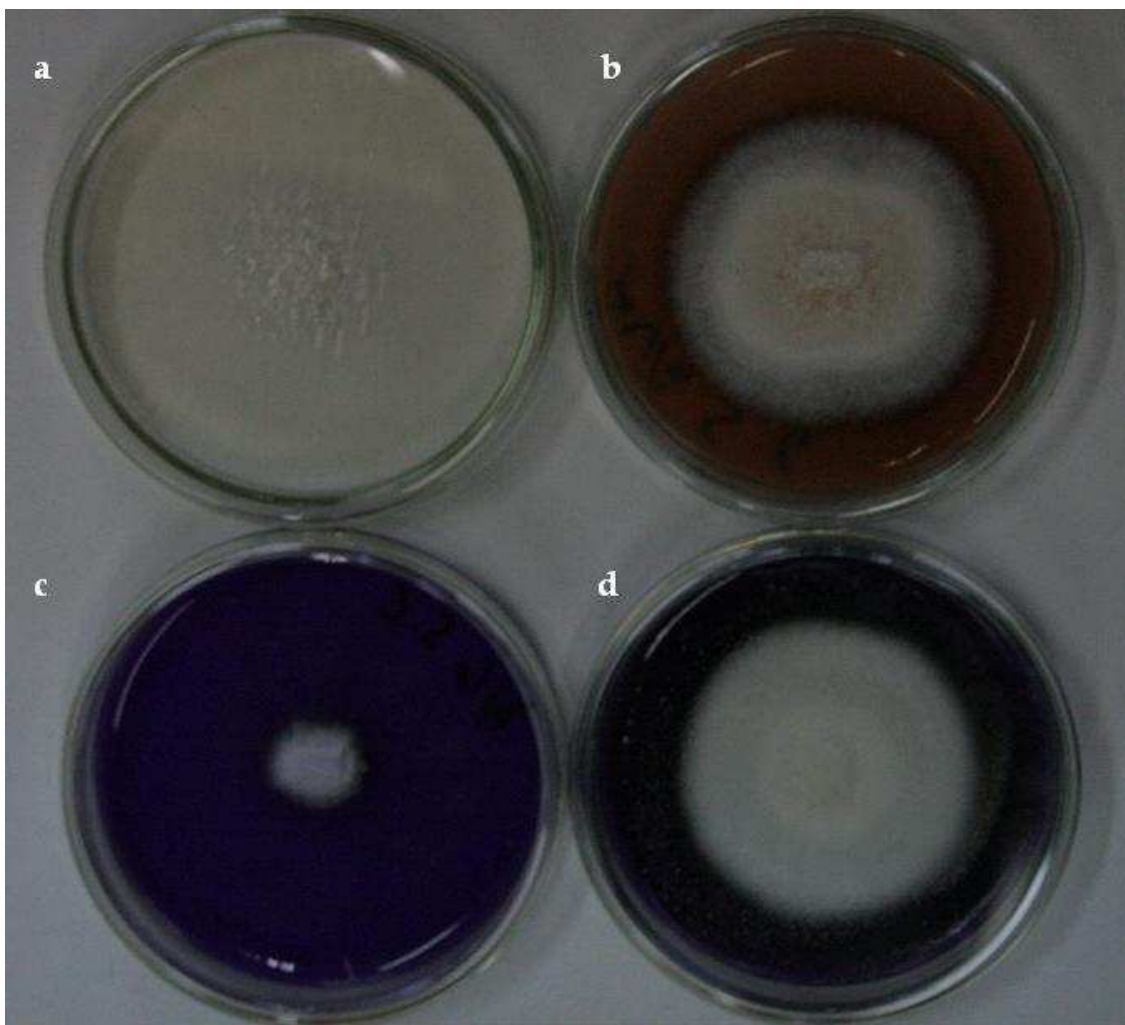
Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATISTICA 5.1 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se calcularon valores medios y desviación estándar de las medias. Las diferencias significativas de medios se ensayaron por el método de Tukey. El ajuste adecuado de los datos de modelo de Freundlich fue probado con ANOVA.

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Ensayos de crecimiento en placa**

De los colorantes ensayados en las experiencias de decoloración en el capítulo 3, sólo dos mostraron efecto contundente sobre el crecimiento la cepa E47 de *Ganoderma lucidum*, el verde de malaquita y el violeta de genciana, ambos pertenecientes a la familia de los trifenilmetanos. La decoloración se intentó en medio GG suplementado con diversos inductores conocidos de la lacasa, pero aún así el violeta de genciana no pudo ser decolorado en ese medio.

Entre los posibles inductores de la decoloración ensayados se encontró que el ácido vainílico, a pesar de no mostrar este efecto, restauraba el crecimiento en diámetro de la colonia a pesar de estar presente el violeta de genciana. En la figura 1 se observa el crecimiento en medio GG agarizado en ausencia y presencia de violeta de genciana y ácido vainílico. Los resultados de las mediciones de crecimiento en diámetro de las colonias se exponen en la figura 2. Se observa una inhibición moderada causada por el ácido vainílico y una inhibición notable en el caso del violeta de genciana. Contra lo esperado, la combinación de ambos compuestos no es sinérgica, sino que el crecimiento obtenido es semejante al medido en el caso del ácido vainílico solo.



**figura 46:** *G. lucidum* cepa E47 luego de diez días de crecimiento en medio GA; (a) control, (b) con ácido vainílico 1mM, (c) con violeta de genciana 50 uM, (d) con ácido vainílico 1mM y violeta de genciana 50 uM. Ver explicación en el texto.

Las curvas de crecimiento en diámetro (figura 2) muestran el mismo efecto y los cultivos utilizados se mantuvieron vivos hasta el día 20 para comprobar que no se produjera degradación del colorante. En todas las cajas se midieron las enzimas oxidativas lacasa, manganeso peroxidasa y lignin peroxidasa sin encontrar actividades.



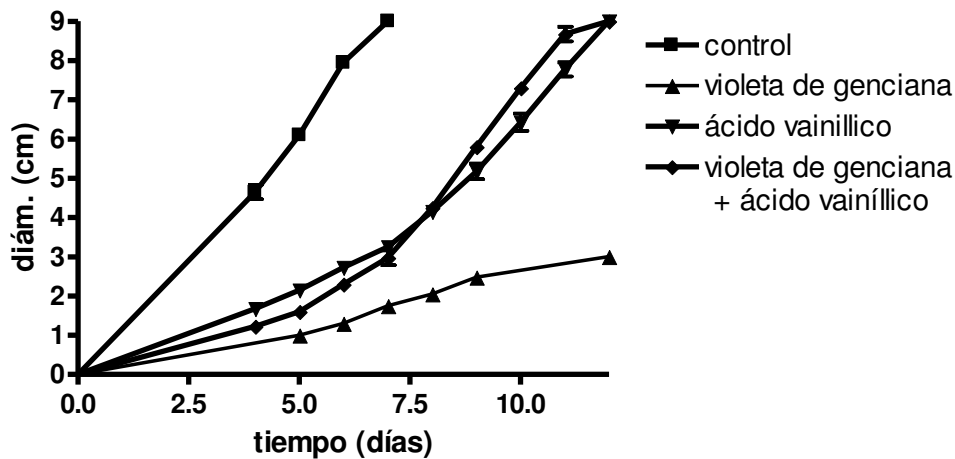


figura 47: crecimiento en diámetro de colonia en control de GA, en medio GG adicionado con ácido vainílico 1 mM, con violeta de genciana 20  $\mu$ M, y con ambos.

Se sustituyó el violeta de genciana por otras sustancias de conocida toxicidad para los hongos a fines de ver la especificidad del efecto y se encontró que la disminución de la toxicidad también ocurre frente al cadmio, nistatina, clotrimazol y verde de malaquita en las concentraciones indicadas en la figura 3. Allí se compara el crecimiento en el medio adicionado con el tóxico, y el mismo en presencia de ácido vainílico. En el caso del arsénico no se encontraron diferencias significativas.

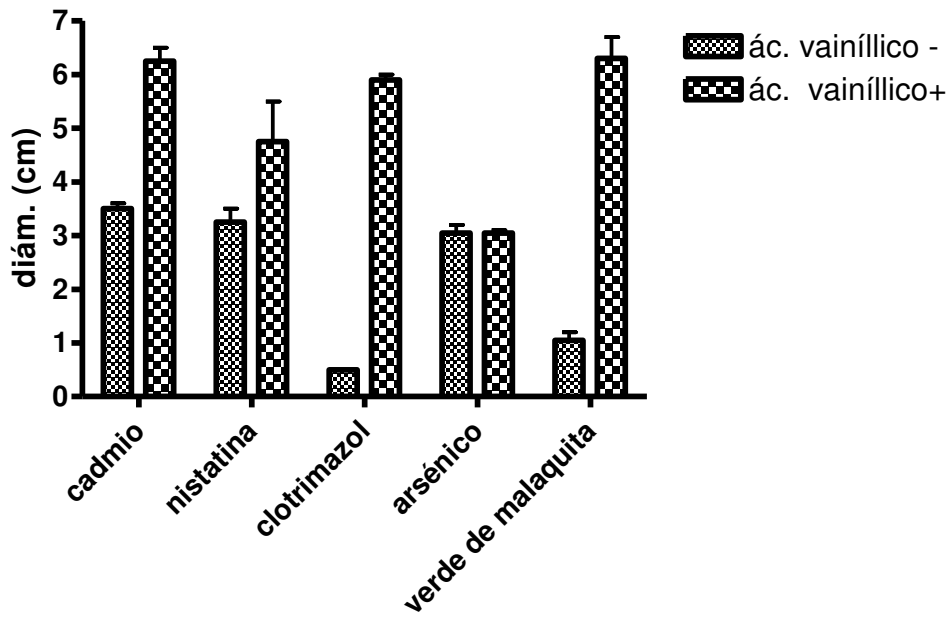


figura 48: crecimiento en diámetro de colonia en medio GG con distintos inhibidores del crecimiento (verde de malaquita 50  $\mu$ M, clotrimazol 25 mg/ml, nistatina 3 mg/ml, arsénico 2.5 mM y cadmio 2.5 mM) en presencia y ausencia de ácido vainílico 1mM.

Se realizaron cultivos en placa de petri en medio GG con distintas dosis de clotrimazol para determinar la dependencia entre la concentración del tóxico y la protección del ácido vainílico. Las curvas de crecimiento resultantes se observan en la figura 4. Todas las concentraciones de clotrimazol ensayadas inhibieron por completo el crecimiento del hongo, por lo que en la figura se muestran las curvas correspondientes a los cultivos en presencia de ácido vainílico. A la concentración de 5 ug ml<sup>-1</sup> de antimicótico la toxicidad se revierte por completo. En concentraciones superiores se obtuvo crecimiento, pero siempre inferior al control.

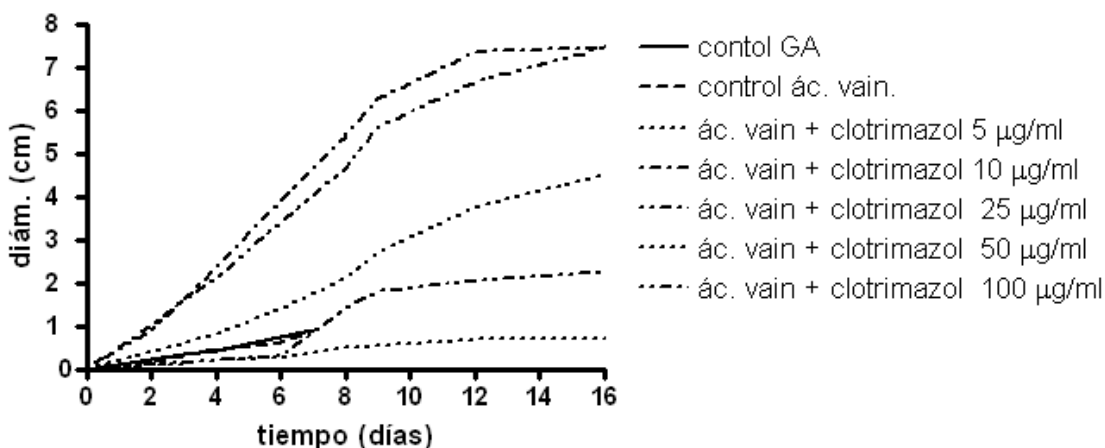


figura 49: efecto de la dosis de clotrimazol en el crecimiento en diámetro de la colonia en presencia y ausencia de ácido vainílico 0.1 mM. No hubo crecimiento en ausencia del mismo en ninguna dosis de clotrimazol.

#### 4.3.2 Crecimiento en medio líquido

A fines de verificar el efecto usando un estimador del crecimiento más directo que el diámetro de colonia, se realizaron cultivos en medio GG líquido con y sin ácido vainílico 0.1 mM en presencia y ausencia de clotrimazol 0.25 ug ml<sup>-1</sup>. Dado que el GV exhibió una alta toxicidad ya que la inhibición total del crecimiento micelial se

observó en todo el rango (1-50 mM) de las concentraciones probadas. Se pesó el micelio seco como se indica en materiales y métodos. Las curvas de crecimiento resultantes se muestran en la figura 5. Se observa que el crecimiento se restituye completamente en presencia de ácido vainílico. Además de verificar el efecto utilizando el peso seco, esta experiencia permite extender los resultados a un medio de cultivo líquido.

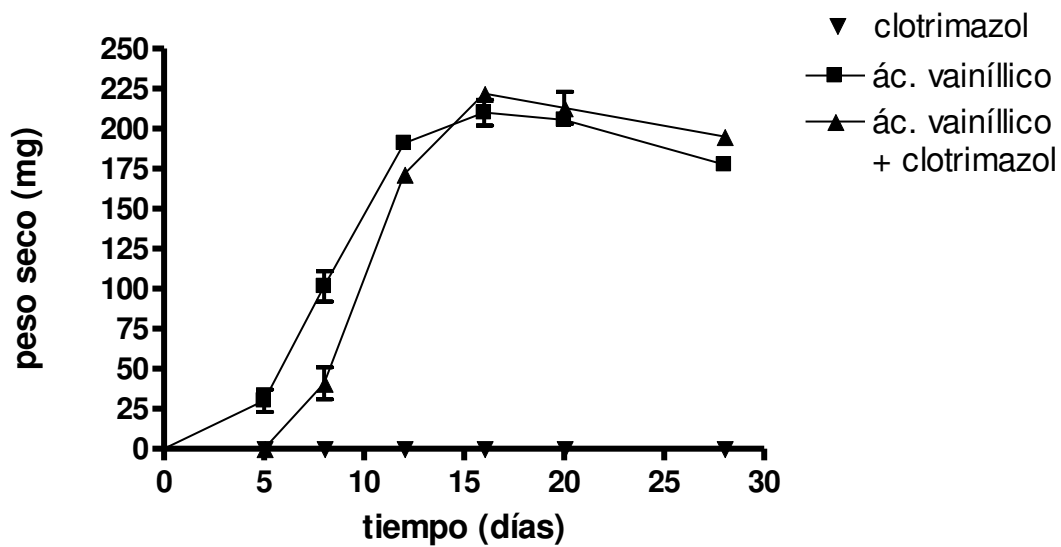


figura 50: curvas de crecimiento en medio GG líquido en presencia de ácido vainílico 0.1 mM y clotrimazol 25 ug/ml y los dos compuestos juntos. El clotrimazol solo no permite el crecimiento del hongo.

### **4.3.3 Efecto de la dosis de ácido vainílico**

Con el fin de establecer el intervalo de concentración de VA capaz de proteger *G. lucidum* contra efecto tóxico de la GV (50 mM), la cepa E47 se cultivó durante Se realizaron cultivos en placa con una concentración elevada de violeta de genciana 7 días a 28 ° C con un intervalo de concentraciones de 0,0001 a 10 mM de VA (figura 6). Se utilizaron como control las mismas concentraciones de ácido vainílico en ausencia de violeta de genciana. Concentraciones extremadamente bajas de VA causaron un significativo efecto protector extensión radial del halo de crecimiento en placas suplementadas con 0,0001 mM de VA más GV era de hasta 20% a la obtenida en las placas de control (sin adición de GV y VA). Las concentraciones aumentadas de VA 0,01 a 5 mM mejoraron el crecimiento radial hasta en un 70%-80%, el subsiguiente aumento de la concentración VA no causó aumento posterior de crecimiento. Ninguno de los tratamientos mostró la tasa de crecimiento comparable con el control, lo que sugiere que VA podría ejercer algún efecto tóxico, además de la protección.y esto se verifica en la disminución en el tamaño de micelio de las concentraciones más altas que muestran el efecto tóxico de VA. A esta concentración (10 mM), las placas de agar se volvió oscuro luego del día 20, probablemente debido a la polimerización de unidades fenólicas. Las columnas correspondientes al crecimiento en violeta de genciana solo corresponden al tamaño del inóculo, ya que no se observa crecimiento en diámetro a esa concentración.

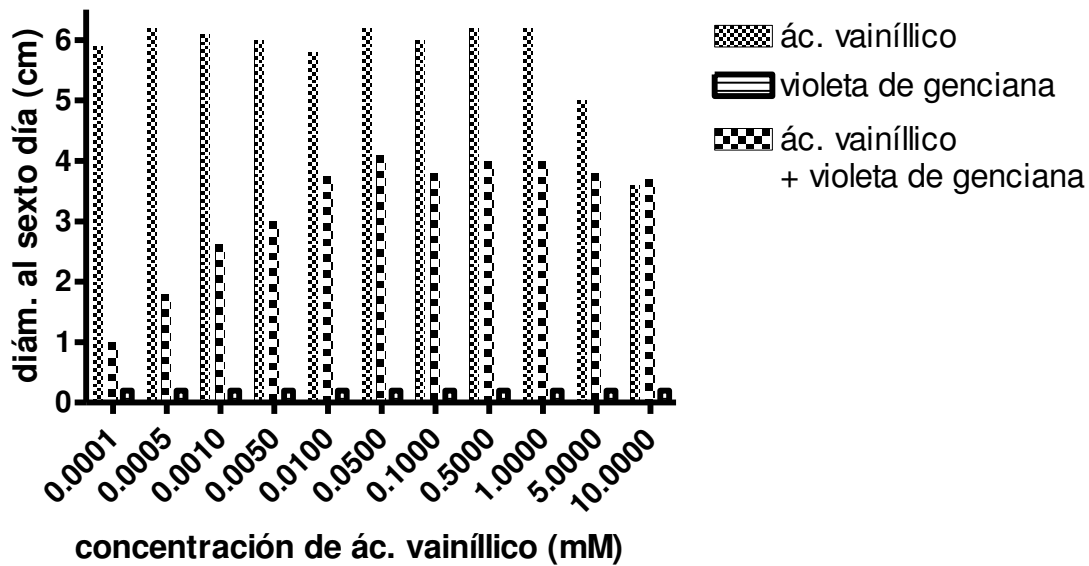


figura 51: crecimiento en diámetro de la colonia al sexto día en medio conteniendo distintas concentraciones de ácido vainílico en presencia y ausencia de violeta de genciana en alta concentración (50 $\mu$ M). No se observa crecimiento en violeta de genciana sin ácido vainílico y el diámetro representado en las columnas correspondientes indica el inóculo.

Se probó la eficacia de distintos compuestos aromáticos para promover el efecto protector en medio GG agarizado con violeta de genciana 20  $\mu$ M. En la figura 8 se muestra el crecimiento alcanzado al cabo de seis días (diámetro de colonia).

#### 4.3.4 Screening de compuestos aromáticos protectores

Los cultivos de la cepa E47 en medio GG conteniendo GV y cada uno de los compuestos protectores, mostraron que 4 de los 12 compuestos evaluados ejercieron un efecto protector frente a la toxicidad del GV (figura 7). Los tamaños colonia en el día 6 fueron similares en VA, vainillina, guayacol y ácido ferúlico (tasas medias de crecimiento: entre 0,9 y 1,1 cm 1 día-).

El crecimiento en presencia de 10 mM GV en medios suplementados con estos compuestos no se retrasó respecto a las placas de control (sin GV). Los otros compuestos ensayados no mostraron este efecto protector.

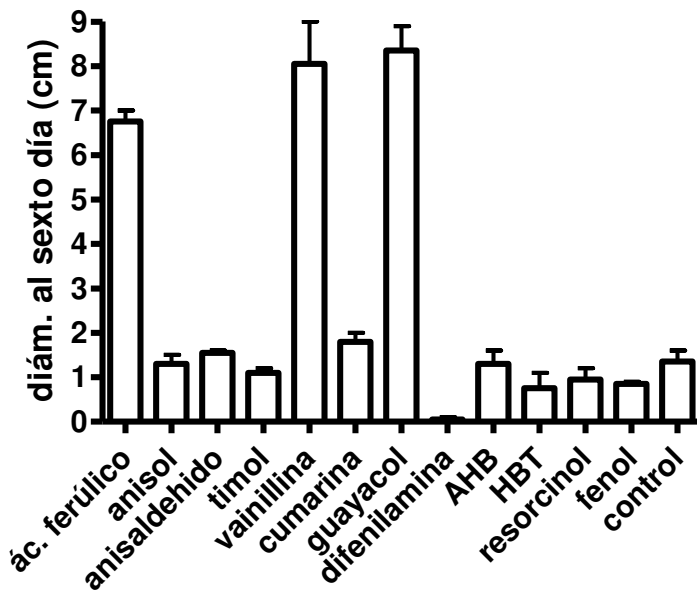


figura 52: efecto en el crecimiento en diámetro de la colonia de seis días en medio AG – violeta de genciana 20 uM adicionado con los siguientes compuestos: resorcinol (1 mM), guayacol (1 mM), ácido ferúlico (1 mM), ácido vainílico (1 mM), vainillina (0.5 mM), cumarina (0.5 mM), difenilamina (0.1 mM), anisaldehído (1 mM), anisol (1 mM), timol (1 mM), AHB(1 mM), HBT (1 mM) y fenol (1 mM).

El crecimiento de *G. lucidum* fue inhibido en un 90% en cultivos con sólo GV 10 mM y totalmente inhibido a concentraciones más altas. En cuanto a las actividades enzimáticas ligninolíticas, ni la lacasa ni la MnP mostraron diferencias en los

títulos medidos en explantos de agar de las placas con y sin VA. Además, lacasa (0,4 U g<sup>-1</sup>) y MnP (50 mU g<sup>-1</sup>) se detectó sólo después de 20 d, cuando micelio cubierto completamente el medio de las placas.

#### 4.3.5 Ensayos de adsorción

Se cuantificó la adsorción de violeta de genciana agregado a cultivos en medio GG líquido de 20 días. Se llevó la concentración a 12 uM para poder medir sin dilución la absorbancia a 590 nm y reponer la alícuota en el cultivo. La figura 8 muestra el descenso de la concentración de violeta de genciana en cultivos en presencia de ácido vainílico 0.1 mM y control sin este compuesto. A fines de descartar la degradación enzimática del violeta de genciana, el micelio se eluyó a posteriori tres veces en alcohol metílico, recuperándose el 92% del colorante adsorbido. Se comparó el peso seco de los cultivos con y sin ácido vainílico y no se encontraron diferencias significativas.

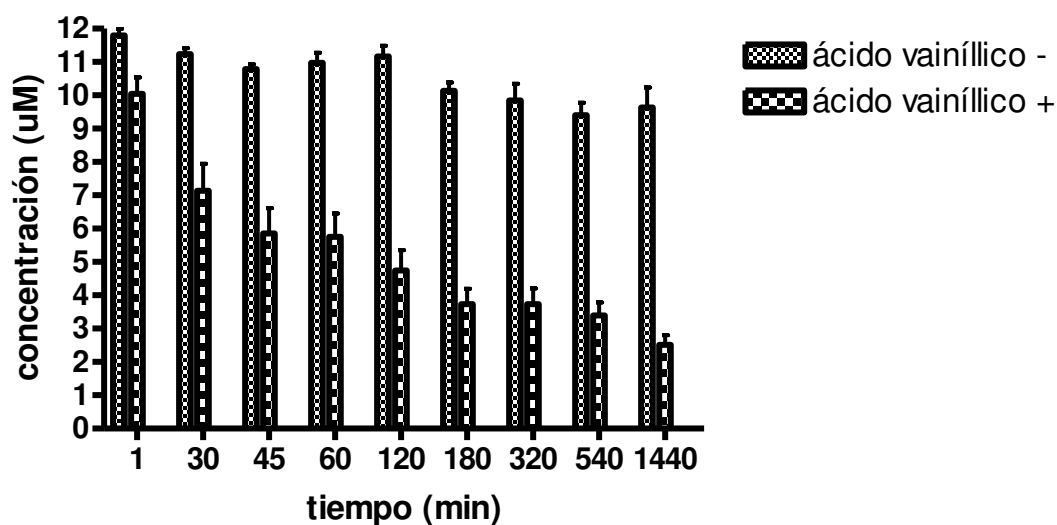


figura 53: remoción del colorante violeta de genciana en medio acuoso por parte del ECM de cultivos en medio líquido de 20 días en presencia y ausencia de ácido vainílico.



Se compararon los pH's iniciales y finales de cultivos a 20 días en medio líquido GG antes y después del cultivo y no se encontraron diferencias que expliquen la adsorción diferencial de los distintos micelios. Estos resultados se consignan en la figura 9.

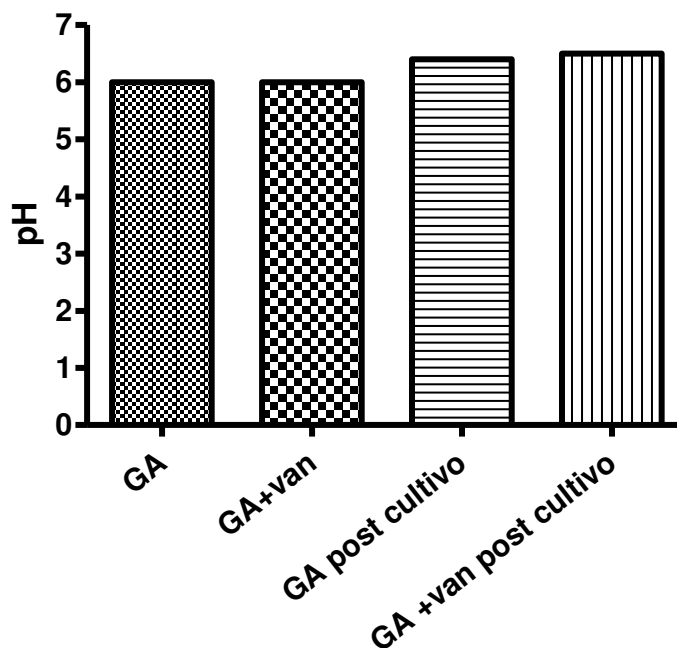
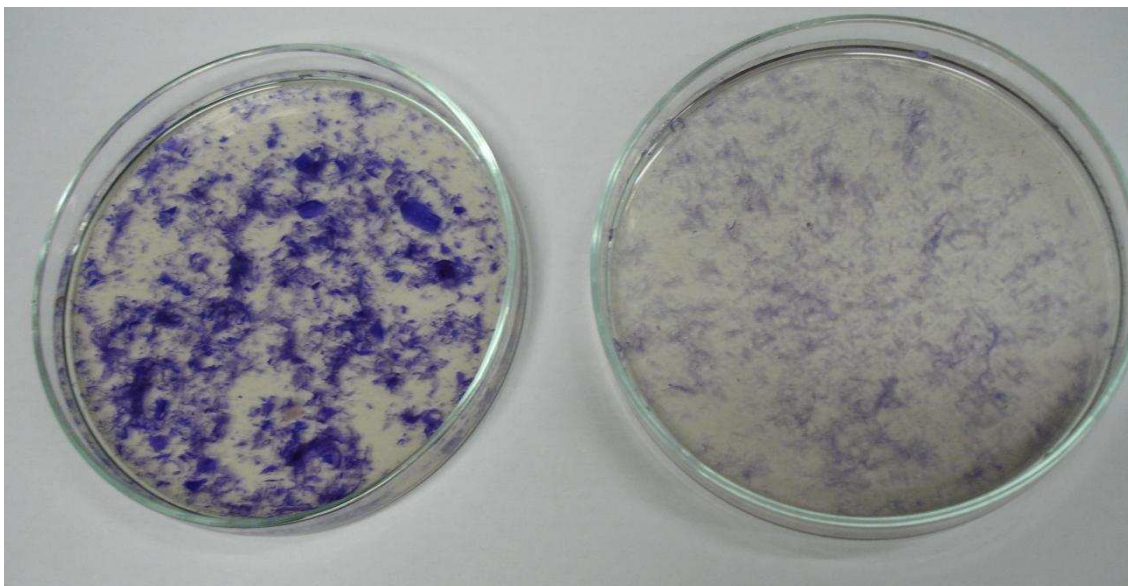


figura 54: cambio de pH de los medios de cultivo líquidos durante el cultivo de la cepa E47.

#### 4.3.6 Capacidad de adsorción de ECMM

ECMM fue aislado de *G. lucidum* micelios que se producen con y sin VA y utilizado para probar la adsorción de GV. Diferencias obvias se pudo observar al comparar los dos tipos de ECMM, ensayos utilizando ECMM obtenido a partir de cultivos con VA exhibió una fuerte coloración violeta. El GV sólo pudo ser desorbido en 1:1 etanol: agua, el GV desorbido en agua fue indetectable. La cinética de adsorción de GV sobre ECMM se realizó a pH 6, utilizando ECMM aislado a partir de micelios de cultivos con 1 mM VA (ECMM +) y sin VA (ECMM-) (figura 10).

Aunque los equilibrios en ECMM se alcanzaron simultáneamente (después de 5 h de tiempo de contacto), la captación GV aumentó de menos de 10 mg/g en la ECMM- a más de 127 mg/g en la ECMM+. En términos de eliminación de color, se observó que la reducción en la absorbancia fue de 20% y 86% usando ECMM-y ECMM+, respectivamente.



**figura 55: ECMM separada de cultivos en medio líquido con ácido vainílico (izquierda) y sin el mismo (derecha) teñidos con VG durante 24 hs, centrifugados y resuspendidos en agua.**

La cinética de adsorción del GV al micelio de *G. lucidum* se llevó a cabo con diferentes concentraciones de GV en cultivos con y sin VA a pH 6. El equilibrio se alcanzó después de 4 h de tiempo de contacto con los tres fungicidas concentraciones probadas. El sistema alcanzó alrededor de 70% de adsorción dentro de 2 h de tiempo de contacto independientemente de la concentración (datos no mostrados).

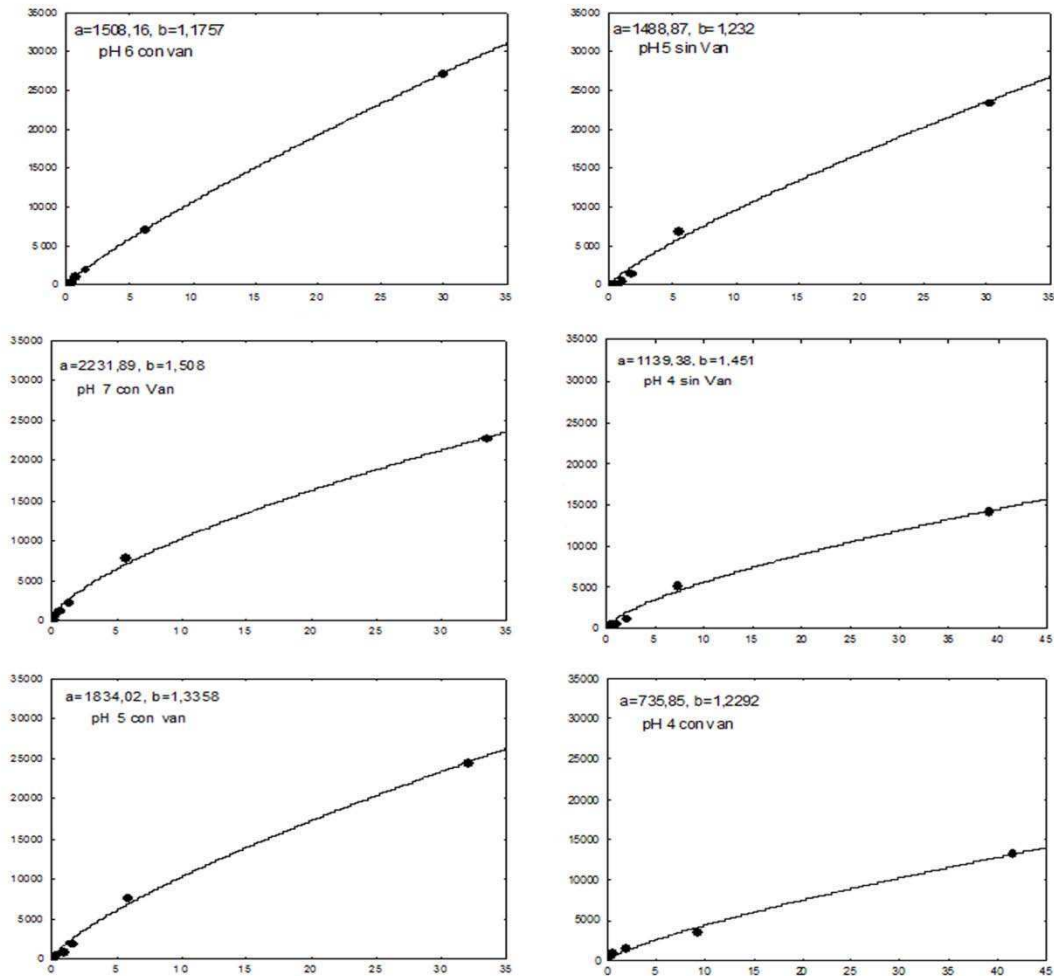


figura 56: algunas de las curvas de adsorción de GV (mg/g) en función de la concentración de GV (mM) obtenidas a fines de calcular los parámetros de Freundlich.

Es sabido que el pH influye en gran medida la capacidad de adsorción y la intensidad. Para estudiar este efecto, se realizaron experimentos usando fosfato citrato 0,1 M de tampón en la gama de pH 4-7. Dado que las intensidades de color de GV podría ser influenciado por los valores de pH, concentraciones del colorante se estimaron a partir de curvas de calibración realizados a cada pH ensayados. Los datos obtenidos de  $q_e$  y  $C_{e,q}$  a diferentes concentraciones de GV y el rango de pH 4-7, se utilizaron sin ninguna transformación previa para ajustarse a la ecuación de Freundlich como se muestra en la figura 11. Los coeficientes de Freundlich  $a$  (capacidad) y  $b$  (intensidad) obtenidos a partir de los experimentos

que usan micelios que cultivados con y sin GV a diferentes pH se representan en la Tabla 1 ambos se estimados por regresión no lineal. Los altos valores de  $R^2$  proporcionan una fuerte evidencia de que el modelo refleja con precisión el proceso. Los valores  $R^2$  fueron  $\geq 0,95$ , lo que significa que más del 95% de la variabilidad observada en la adsorción GV puede ser explicada por el modelo (excepto a pH 4 sin VA). A partir de estos resultados, es evidente que la adsorción máxima de colorante se alcanzó a intervalo de pH 6-7 en los tratamientos con presencia de VA. La cantidad de colorante eliminado de la fase líquida fue de más del 90% con 0,1 mM de GV.

C	Sin VA				Con VA (1 mM)			
	pH4	pH5	pH6	pH7	pH4	pH5	pH6	pH7
<i>a</i>	1139.3	1488.8	674.02	824.35	735.85	1834.018	1508.1	2231.89
	8	6					5	
<i>b</i>	1.451	1.232	0.758	0.8299	1.2918	1.336	1.176	1.508
$R^2$	0.78	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.95

**Tabla 8:** Coeficientes de Freundlich *a* (capacidad) y *b* (intensidad) obtenidos a partir de los experimentos que usan micelios que cultivados con y sin GV a diferentes pH y  $R^2$  asociado a cada estimación.

#### 4.3.7 Adsorción de cadmio

La cantidad de Cd adsorbido a los micelios se midió por espectrometría de emisión en el hongo cultivado con VA 0,1 mM. La adsorción de Cd se midió añadiendo  $\text{NO}_3\text{Cd}$  hasta 0,5 mM a cultivos líquidos 20 días de edad con VA 0,1 mM y la cuantificación de la Cd restante en el sobrenadante tras 24 horas de

exposición. Cultivos líquidos sin VA añadido sirvieron como controles. Los valores medios de Cd eliminado en presencia de VA fueron 18,17 ppm, significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) a la de los cultivos sin VA (6,92 ppm).

#### ***4.3.8 Estructura de los compuestos protectores***

En la figura 9 se muestran las estructuras de los cuatro compuestos en los que se detectó el efecto de protección frente a los distintos tóxicos: ácido vainílico, ácido ferúlico, guayacol y vainillina, todos ellos consistentes en fenoles sustituidos con un grupo metoxi en posición orto. El más simple es el guayacol, que no presenta ningún otro sustituyente. Se muestran también en dicha figura algunos de los otros compuestos ensayados cuya estructura es semejante a los cuatro activos, pero que no producen protección frente al violeta de genciana.

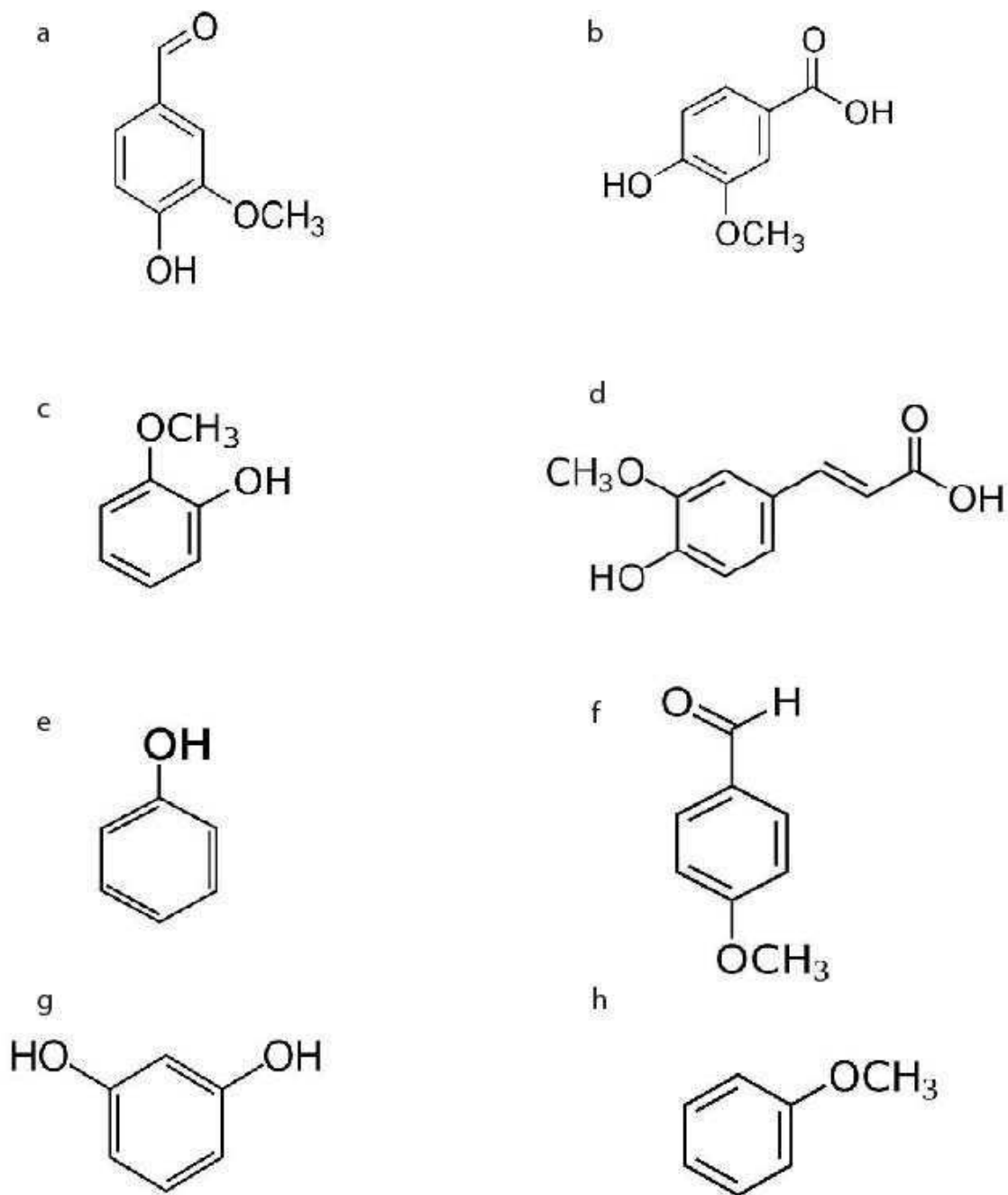


figura 57: (a-d) estructura química de los compuestos que ejercen protección frente al violeta de genciana a, vainillina; b, ácido vainílico; c, guayacol; d, ácido ferúlico; (d-e) compuestos similares que no producen protección frente al violeta de genciana. e, fenol; f, anisaldehído; g, resorcinol; h, anisol. ver explicación en el texto.

#### **4.4 Discusión**

Los hongos de la pudrición blanca se han demostrado ser eficaces en la transformación y la mineralización de una amplia gama de contaminantes orgánicos xenobióticos, en la mayoría de los casos este proceso de oxidación se lleva a cabo por enzimas ligninolíticas debido a su amplia especificidad de sustrato y alto potencial redox (24). La aplicación de los hongos de pudrición blanca para la biodegradación de los contaminantes orgánicos ya se ha estudiado desde hace varias décadas, Sin embargo, el problema que persiste en la actualidad es la tasa de crecimiento lento o incluso la inhibición total del crecimiento debido a la sensibilidad a las condiciones de crecimiento en ambientes contaminados. Para omitir el paso de la inoculación in situ fue propuesta la inmovilización de los hongos en los reactores biológicos (25), sin embargo, un aumento concomitante de los costos acompaña a esta metodología. Por lo tanto, no sólo las investigaciones sobre las enzimas ligninolíticas deben contribuir a los planes de biorremediación, sino mecanismos de resistencia también. Entre otras características se ha resaltado por ejemplo la importancia de la tolerancia a altas concentraciones de metales pesados en los hongos aislados.

El efecto protector fue ejercido por todos los compuestos derivados de guayacol (ácido ferúlico, ácido vinílico, vainillina y guayacol). Por lo tanto, la conclusión de que el efecto protector se relaciona con la estructura "vainilloide" es apoyada fuertemente por este trabajo. Los experimentos en placas mostraron que todos los vainilloides testeados tuvieron un efecto protector en el crecimiento de los hongos, mientras que otros derivados aromáticos eran incapaces de proteger contra la toxicidad GV.

En un intento de obtener una mayor comprensión del efecto protector de VA, se testeó una amplia gama de concentraciones de VA. Es de destacar que aún concentraciones extremadamente bajas de VA (0,0001 mM) causaron un efecto protector significativo. Este efecto no puede atribuirse a VA per se (por ejemplo,

actuar como antioxidante), pero es probable que su presencia haya desencadenado la producción o la liberación de compuestos que inactivan GV. Puesto que los hongos de podredumbre blanca son eficientes en la degradación de xenobióticos aromáticos con enzimas ligninolíticas, la inactivación podría ser producido por degradación enzimática del GV por el incremento de la producción de lacasa y MnP. Informes previos mostraron que la inducción lacasa varía con el organismo y parece ser específica para ciertos compuestos aromáticos. En presencia de guayacol y ácido ferúlico se indujo la producción de lacasa en varias especies de hongos (26, 27) la vainillina en *Phanerochaete flavid-alba* (28). Sin embargo, en *G. lucidum* se observó que a) la producción de enzima ligninolítica se aumentó ni en la presencia de GV ni con otros xenobióticos en los medios de cultivo jóvenes en los que ya había efecto de protección; b) decoloración de GV se observó mucho después de crecimiento completo de los hongos en placas, c) VA también ejerció un efecto protector frente a los metales pesados, siendo que estos no pueden ser degradados enzimáticamente. Por lo tanto la resistencia a hongos a través de la degradación de GV se puede descartar. Otro mecanismo de inactivación que puede ocurrir en sistemas que comprenden soluciones acuosas de material contaminante (en particular colorantes) y sólido es de adsorción. En informes anteriores se demostró que la pared de la célula era el sitio principal de biosorción en *Rhizopus* y *Cunninghamella elegans*. Aproximadamente el 90% de la materia seca de la pared celular de estos hongos contiene quitina-quitosano, que ha sido implicado en el secuestro de una variedad de sustancias aromáticas recalcitrantes (29-33).

La capacidad de adsorción de los micelios de *G. lucidum* E47 mostró a ser mayor en los cultivos en presencia de GV, sobre todo a pH 7, pero no lo suficiente para explicar las diferencias en el crecimiento. Sin embargo, ECMM separado de micelio obtenido en cultivos cultivados con VA exhibió un aumento mucho mayor en la capacidad de adsorción que sugiere que el principal responsable del efecto protector son el ECMM. Hay una fuerte evidencia de efectos protectores de los compuestos vainilloides contra el estrés oxidativo en cultivos de células animales (34). Además se conoce su actividad neuromoduladora (35), analgésica (36) y



demás referidas al ámbito de la fisiología animal (37-42) pero no hay ninguna referencia en la literatura a efecto de estos compuestos sobre la estructura de matrices extracelulares de ningún tipo. Sin embargo, las diferencias en la composición de la pared celular fúngica ejercida por los nutrientes se han reportado ser la EPS (el componente principal de la ECMM) los componentes más afectados en presencia por ejemplo de selenio (43). El significado biológico de este efecto es aún desconocido. Muchos compuestos de esta familia son también resultado de la degradación oxidativa de la lignina, y por lo tanto ubicuo en el ambiente natural de los hongos de pudrición blanca. Con respecto a la falta de dependencia de la dosis y el efecto protector, que muestran que la vainilloide no se consume por el micelio como sustrato para una reacción en lugar de ello parece actuar como inductor de un ECMM particular. El efecto positivo sobre el crecimiento micelial podría ser el resultado de la inmovilización de los compuestos tóxicos por la matriz ECMM. Probablemente, la ECMM producido en presencia de vainilloides debería actuar como una barrera a través de la adsorción y la inmovilización de la GV así el fungicida es incapaz de llegar a la pared de la célula para ser translocado. Estudios adicionales en esta dirección puede aclarar el mecanismo de la resistencia adquirida por el hongo como respuesta a vainilloides. Este efecto ha sido observado en las bacterias y algunos hongos (44) en presencia de metales pesados en solución. La Biorremediación mediante adsorción micelial ha sido ampliamente ensayada, especialmente para la contaminación por metales pesados, ya que no pueden ser degradados. El objetivo de la exposición a la masa del micelio es secuestrar el contaminante desde el agua y concentrarlo para deposición o reutilización. Además de la biosorción por hongos muertos ha habido un creciente interés en cepas tolerantes con la capacidad de degradar los contaminantes. Por lo tanto, la posibilidad de aumentar la capacidad de adsorción a través de la adición de pequeñas cantidades de vainilloides daría lugar a una mejora del proceso de biorremediación.

Este estudio es el primer informe que ha comprobado experimentalmente que vainilloides podía infligir un mayor efecto protector al estrés químico en el blanco

podrición de hongos *G. lucidum* y de tal modo que permite que el hongo crezca en concentraciones de xenobióticos que de otro modo serían un limitante.

## Referencias

1. A. Leonowicz, J. Trojanowski, B. Orlicz, *Acta Biochim. Pol.* **25**, 369 (1978).
2. M. T. Cambria, S. Ragusa, V. Calabrese, A. Cambria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **163**, 415 (2011).
3. A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, D. L. Crawford, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3598 (1992).
4. J. Wang, C. Chen, *Biotechnol. Adv.* **24**, 427 (2006).
5. S. N. Dodic, S. D. Popov, S. L. Markov, *Nahrung* **45**, 59 (2001).
6. R. Dhankhar, A. Hooda, *Environ. Technol.* **32**, 467 (2011).
7. S. Deng, Y. P. Ting, *Langmuir* **21**, 5940 (2005).
8. W. Lo, H. Chua, K. H. Lam, S. P. Bi, *Chemosphere* **39**, 2723 (1999).
9. K. Pakshirajan, T. Swaminathan, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157**, 159 (2009).
10. R. Pan, L. Cao, H. Huang, R. Zhang, Y. Mo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 997 (2010).
11. Q. Yang, J. L. Wang, Z. Xing, *Biomed. Environ. Sci.* **18**, 141 (2005).
12. L. Bengtsson, B. Johansson, T. J. Hackett, L. McHale, A. P. McHale, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 807 (1995).
13. F. Zakeri *et al.*, *Bioresour. Technol.* **101**, 9163 (2010).
14. K. Akhtar, M. W. Akhtar, A. M. Khalid, *Water Res.* **41**, 1366 (2007).
15. F. Glombitza, L. Eckhart, A. Hummel, *Res. Microbiol.* **148**, 517 (1997).
16. A. K. Haritash, C. P. Kaushik, *J. Hazard. Mater.* **169**, 1 (2009).
17. T. Gonzalez *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7083 (2003).
18. S. Ohga, D. J. Royse, *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 111 (2001).
19. P. J. Collins, A. Dobson, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3444 (1997).
20. M. C. Colao, A. M. Garzillo, V. Buonocore, A. Schiesser, M. Ruzzi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 153 (2003).

21. S. Kajita *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 194 (2004).
22. A. Y. Yus, M. D. Mashitah, S. Bhatia, *Bioresour. Technol.* **99**, 8549 (2008).
23. P. Simmons, I. Singleton, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 278 (1996).
24. H. A. Kulikova, O. I. Kliain, E. V. Stepanova, O. V. Koroleva, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **47**, 619 (2011).
25. M. Gopal, K. Pakshirajan, T. Swaminathan, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **102-103**, 227 (2002).
26. D. S. Arora, P. K. Gill, *Bioresour. Technol.* **77**, 89 (2001).
27. E. Malarczyk, A. Jarosz-Wilkolazka, J. Kochmanska-Rdest, *Nonlinearity. Biol. Toxicol. Med.* **1**, 167 (2003).
28. J. C. Ruiz, T. de la Rubia, J. Perez, L. J. Martinez, *FEMS Microbiol. Lett.* **212**, 41 (2002).
29. G. Naja, C. Mustin, J. Berthelin, B. Volesky, *J. Colloid Interface Sci.* **292**, 537 (2005).
30. B. Volesky, H. A. May-Phillips, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 797 (1995).
31. B. Volesky, Z. R. Holan, *Biotechnol. Prog.* **11**, 235 (1995).
32. R. H. Vieira, B. Volesky, *Int. Microbiol.* **3**, 17 (2000).
33. G. Naja, C. Mustin, B. Volesky, J. Berthelin, *Environ. Technol.* **27**, 109 (2006).
34. A. Szallasi *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* **356**, 81 (1998).
35. Y. G. Suh *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 4389 (2003).
36. I. Kissin, *Anesth. Analg.* **107**, 271 (2008).
37. I. Kissin, *Anesth. Analg.* **107**, 271 (2008).
38. A. Rescigno, G. M. Casanola-Martin, E. Sanjust, P. Zucca, Y. Marrero-Ponce, *Drug Test. Anal.* **3**, 176 (2011).
39. A. Szallasi, P. M. Blumberg, *Pharmacol. Rev.* **51**, 159 (1999).
40. G. Appendino *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 132 (2007).
41. S. Minowa, S. Tsuchiya, S. Horie, K. Watanabe, T. Murayama, *Eur. J. Pharmacol.* **428**, 349 (2001).

42. T. Biro *et al.*, *Brain Res. Mol. Brain Res.* **56**, 89 (1998).
43. J. Turlo *et al.*, *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **73**, 1211 (2010).
44. S. Congeevaram, S. Dhanarani, J. Park, M. Dexilin, K. Thamaraiselvi, *J. Hazard. Mater.* **146**, 270 (2007).
45. E. Fourest, C. Canal, J. C. Roux, *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 325 (1994).