

Tesis Doctoral

Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*

Carabajal, Maira Lía

2014-06-27

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carabajal, Maira Lía. (2014-06-27). Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Carabajal, Maira Lía. "Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-06-27.

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

**Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante
de pudrición blanca *Trametes versicolor***

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

Maira Lia Carabajal

Director de tesis: Dra. Laura Noemí Levin

Consejero de estudios: Dr. Bernardo Ernesto Lechner

Defensa de la tesis: 27 de junio de 2014, Buenos Aires

Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*

Resumen

Los hongos causantes de pudrición blanca, producen enzimas lignolíticas, inespecíficas y altamente oxidativas, con capacidad para degradar distintos contaminantes. Los compuestos fenólicos son un grupo de moléculas orgánicas cuyo uso masivo industrial condujo a la contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres, resultando en su clasificación como contaminantes prioritarios. En el presente trabajo se realizó un relevamiento de cepas nativas de hongos de pudrición blanca en búsqueda de microorganismos capaces de ser empleados en la degradación y detoxificación de fenoles y derivados. Como resultado de dicho relevamiento se seleccionó a *Trametes versicolor* BAFC 2234 por su capacidad para degradar distintos compuestos fenólicos (fenol, ácido gálico, 2,6 dimetoxifenol y guayacol) y por su habilidad para utilizar el fenol como única fuente de carbono. Se analizó el secretoma de *T. versicolor* creciendo en medio de cultivo natural jugo de tomate suplementado con cobre y manganeso empleando el enfoque proteómico. Se identificó un número considerable de las proteínas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica y entre éstas, hidrolasas, peroxidasas y oxidasas fueron las enzimas más abundantes. Se purificaron diversas enzimas lignolíticas: una polifenol oxidasa (lacasa), tres Mn-peroxidasas y una versatil peroxidasa. Esta última enzima no había sido purificada previamente en esta especie. Se detectó también por primera vez presencia de peroxidasa decolorante de tintes en *T. versicolor*. Cultivos de *T. versicolor* removieron eficientemente fenol y nitrofenol, pudieron también decolorar el tinte Azure B y el licor negro, residuo proveniente de la producción de papel. *T. versicolor* removió el 71, 62, 74 y 73% del fenol 15 mM adicionado en tres ciclos repetidos en un periodo de 23 días, inmovilizado en esponja vegetal (*Luffa aegyptiaca*). El hongo inmovilizado removió el 97% del 4-nitrofenol (1 mM) luego de 3 días. Esta cepa además disminuyó la fitotoxicidad de las respectivas muestras tratadas. Se investigó la transformación del fenol por acción de sus enzimas purificadas lacasa y Mn-peroxidasa; y la del 2-, 3- y 4-nitrofenol adicionalmente por la enzima versatil peroxidasa. El hongo produjo lacasa como

principal enzima lignolítica, pero esta enzima purificada no fue capaz de degradar el nitrofenol. Mn-peroxidasa y versatil peroxidasa degradaron 2- y 4-nitrofenol in vitro en porcentajes cercanos al 50%. La lacasa de *T. versicolor* removió 84% del fenol en 4 hs, mientras que un 43% fue removido por la Mn-peroxidasa. Tanto el estudio del secretoma de esta cepa como los ensayos de degradación in vivo e in vitro llevados a cabo, aportan información valiosa sobre el potencial empleo de esta cepa de *T. versicolor* en la biorremediación de efluentes industriales.

Palabras clave: biorremediación, compuestos fenólicos, *T. versicolor*, enzimas lignolíticas

Degradation of phenolic compounds by the white-rot fungus *Trametes versicolor*

Summary

White-rot fungi produce highly oxidative ligninolytic enzymes, nonspecific, with the ability to degrade different pollutants. Phenolic compounds are a group of organic molecules which led to massive industrial pollution of aquatic and terrestrial ecosystems, and as a consequence they are classified as priority pollutants. In this research a selection of Argentinean white-rot fungi was screened for their ability to tolerate and degrade phenolic compounds, searching for organisms capable of being employed in the degradation and detoxification of phenols and derivatives. As a result of this survey was selected *Trametes versicolor* BAFC 2234 because of its capacity to degrade different phenolic compounds (phenol, gallic acid, 2,6 dimethoxyphenol and guaiacol) and its ability to use phenol as sole carbon source. The secretome of *T. versicolor* growing in tomato juice, a natural culture medium, supplemented with copper and manganese was analyzed using the proteomic approach. A considerable number of the identified proteins were related to the degradation/modification of lignocelluloses. Hydrolases, peroxidases and phenoloxidases were the most abundant enzymes produced under the above-mentioned culture conditions. Various lignin-modifying oxidoreductases were successfully purified: one polyphenol oxidase (laccase), three manganese peroxidases (MnP) and one versatile peroxidase (VP), the latter for the first time from *T. versicolor*. The native VP protein has a molecular mass of 45 kDa and an isoelectric point of pH 3.7. Dye decolorizing peroxidases, a just recently discovered group of heme peroxidases, were also found to be secreted by *T. versicolor* for the first time. The study clearly showed that complex plant-based media being rich in phenolics, such as tomato juice, can stimulate the secretion of a broad set of extracellular lignocellulolytic enzymes. Using such natural products as fungal culture media may give the opportunity to investigate plant biomass decomposition as well as the biodegradation of organic pollutants in an environment close to nature. Cultures of *T. versicolor* efficiently removed phenol and nitrophenol, they could also discolor the dye Azure B and black liquor, a residue from paper production. *T. versicolor*

immobilized on a natural sponge-like material from *Luffa aegyptiaca*, removed between 62% and 74% of phenol (15 mM) in three repeated cycles (fed-batch) over a period of 23 days. The immobilized fungus removed 97% of 4-nitrophenol (1 mM) after 3 days. This strain also reduced phytotoxicity of the respective treated samples. Phenol conversion by the action of the purified laccase and MnP was investigated, additionally 2-, 3- and 4-nitrophenol transformation was evaluated by the action of VP. Laccase was the main oxidative enzyme activity measured during the cultivation, and the isolated enzyme oxidized in vitro 84% of phenol (0.5 mM) within 4 h, while 43% was converted by a purified MnP of this strain. After fungal treatment, phenol phytotoxicity decreased noticeably. The purified laccase was not able to degrade nitrophenol, but MnP and VP degraded around 50% of 2- and 4-nitrophenol in vitro. The concentrations of phenol removed by *T. versicolor* are among the highest reported so far, thus, the investigated strain may have good prospects for application in industrial wastewater treatment. For the evaluation of the degradative potential of a fungus and its lignin-modifying system, the characterization of the secretome has proven to be a useful tool, additionally the in vivo and in vitro degradation studies performed during this research, provide valuable information about the potential use of *T. versicolor* in bioremediation of industrial effluents.

Key words: bioremediation, phenolic compounds, *T. versicolor*, ligninolytic enzymes

Agradecimientos

Fueron muchas las personas que me acompañaron y ayudaron de una u otra forma durante el transcurso de mi doctorado. A todas ellas les debo una parte de lo que verán sintetizado a continuación y es por ello que les digo muchas gracias, gracias especialmente a...

Mi directora de tesis, Laura, por abrirme las puertas y mostrarme el hermoso mundo de los hongos. Por darme la oportunidad de formarme en este campo, por guiarme y ayudarme no sólo en lo académico, sino también en lo cotidiano, en la vida diaria.

A Flavia, porque con toda su sabiduría me aconsejó siempre y ayudó a seguir el mejor camino, también por la predisposición y al igual que Laura por dejarme ser parte del laboratorio 8.

A Marcela, Leandro, Nora, Luis, gracias por ayudarme a resolver los problemas y dudas que fueron surgiendo en el camino, y también por las ideas que aportaron.

A Isa, Ema, Fran, Vale, Raul, Ruth, Nahue, Leo, Juli, Euge y Vero, por la ayuda y predisposición, por estar y por todas las risas compartidas. En síntesis, a toda la gente del laboratorio 8, gracias por estos años.

A toda la gente del PHRIDEB y del cuarto piso, muchas gracias, especialmente gracias a Silvia, Victoria, Bernardo, Vicky, Leo y Gonza. Gracias también a Mercedes y Sonia.

A la FCEN-UBA por el lugar de trabajo, a CONICET por la financiación del doctorado y a la Fundación UNSJ y DAAD por el financiamiento de mi estadía en Alemania.

A la gente del laboratrio de Alemania y a Rocío y Eli, gracias porque me ayudaron en una parte muy importante de mi trabajo y también gracias por la calidez.

A Lici, gracias por estar siempre, no puedo comenzar a enumerar porque sería una lista interminable de cosas que agradecer, creo que es más sencillo agradecerte por todo.

A mamá y papá, gracias porque siempre me dieron libertad y me apoyaron en mis decisiones. Y Mati, gracias por todo el cariño.

A mi familia que me ayudó siempre y sobre todo a sobrevivir en Buenos Aires.

A mis amigos, especialmente a Belén, Ale, Caro y Dai, mis amigas del alma, gracias por estar, por escucharme y acompañarme.

En síntesis muchas gracias a todos, gracias de corazón.

A Lici, con todo mi cariño

Contenido

CAPITULO 1: Antecedentes.....	1
1 Antecedentes.....	2
CAPITULO 2: Relevamiento de cepas	7
1 Antecedentes	8
2 Materiales y métodos	10
2.1 Cepas.....	10
2.2 Selección de cepas tolerantes a distintas concentraciones de fenol.....	11
2.3 Relevamiento de la capacidad para crecer en presencia de otras fuentes fenólicas.....	12
2.4 Cultivo en medio líquido	12
2.5 Actividades enzimáticas	13
2.6 Cuantificación de fenoles remanentes	14
2.7 Análisis estadísticos.....	14
3 Resultados	14
3.1 Selección de cepas	14
3.2 Cultivo en medio líquido	17
4 Discusión.....	19
5 Conclusiones	21
CAPITULO 3: Escalado y purificación.....	23
1 Antecedentes	24
2 Materiales y métodos	28
2.1 Cepa fúngica	28
2.2 Selección del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas....	28
2.3 Escalado y producción de enzimas lignolíticas	28
2.4 Purificación de enzimas	29
2.5 Secretoma y análisis de péptidos por nano LC-MS/MS	31
2.6 Métodos enzimáticos	32
2.7 Análisis estadísticos.....	32
3 Resultados	33
3.1 Selección del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas....	33
3.2 Producción y purificación de enzimas	34

3.3	Análisis del secretoma	39
4	Discusión.....	42
5	Conclusiones	46
CAPITULO 4: Remoción de compuestos fenólicos por el hongo libre e inmovilizado .		47
1	Antecedentes	48
2	Materiales y métodos	52
2.1	Transformación de fenol y nitrofenol por <i>T. versicolor</i> in vivo.....	52
2.2	Transformación de fenol por <i>T. versicolor</i> inmovilizado en soporte sintético y natural	53
2.3	Transformación de nitrofenol por <i>T. versicolor</i> inmovilizado en <i>L. aegyptiaca</i>	55
2.4	Evaluación de enzimas.....	55
2.5	Estimación de fenol y nitrofenol.....	56
2.6	Ensayos de fitotoxicidad	56
2.7	Conversión de fenol y 2-, 3- y 4-nitrophenol in vitro	57
3	Resultados	57
3.1	Transformación de fenol in vivo	57
3.2	Transformación de nitrofenol in vivo.....	58
3.3	Transformación de fenol por <i>T. versicolor</i> inmovilizado en soporte sintético y natural	60
3.4	Ensayos de fitotoxicidad	62
3.5	Transformación de fenol y nitrofenol in vitro	63
4	Discusión.....	65
5	Conclusiones	70
CAPITULO 5: Ensayos de decoloración		71
1	Antecedentes	72
2	Materiales y métodos	76
2.1	Decoloración del licor negro.....	76
2.2	Decoloración del colorante Azure B.....	77
3	Resultados	77
3.1	Decoloración de licor negro.....	77
3.2	Decoloración del colorante heterocíclico Azure B	78
4	Discusión.....	79
5	Conclusiones	81

Conclusiones finales	82
Referencias	84

CAPITULO 1

Antecedentes

1.1 Antecedentes

Los hongos tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, son los organismos lignocelulolíticos por excelencia. Producen enzimas capaces de degradar todos los componentes de las paredes celulares de las plantas (celulasas, xilanasas, pectinasas y ligninasas). Entre ellos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina: los que producen la llamada “pudrición blanca” y forman el grupo más importante de microorganismos responsables de la biodegradación del polímero natural más complejo que existe, la lignina (Kirk y Farrell, 1987). Esta categoría definida por el tipo de pudrición que causan en la madera abarca cientos de especies de basidiomicetes. Ciertos ascomicetes del orden Xylariales son también agentes de pudrición blanca (Nilsson et al., 1989; Pointing et al., 2003).

Todos son capaces de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente. Estos hongos degradan la lignina de la madera para acceder a la hemicelulosa y celulosa, los cuales son sus verdaderos sustratos primarios. Estos sustratos también son adecuados para mantener una apropiada producción de enzimas en procesos de biorremediación sobre suelos contaminados (Quintero et al., 2006). El metabolismo ligninolítico, es inducido en general por deficiencia o limitación de nutrientes, principalmente nitrógeno y carbono (Bucke, 1998; Moreira et al., 2000). Este es el primero y más importante sistema catabólico de degradación de xenobióticos que usan estos hongos. La acción de este sistema es estrictamente extracelular y en él intervienen un grupo de hemoproteínas extracelulares denominadas enzimas peroxidasa, conocidas como lignino peroxidasa (LiP, EC1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y versátil peroxidasa (VP, EC 1.11.1.16), junto a la recientemente descubierta peroxidasa decolorante de tintes (DyP, EC 1.11.1.19), un grupo de enzimas productoras de H_2O_2 (glioxal oxidasa, aril alcohol oxidasa, entre otras), un grupo de oxidasas (lacasa) (EC 1.10.3.2), alcohol veratrílico, manganeso y ácidos orgánicos como oxálico o malónico. Las ligninasas son de particular relevancia dado que por su falta de especificidad y alto potencial redox son capaces de actuar sobre una gran variedad de compuestos aromáticos. Las MnPs ejercen su acción oxidativa indirectamente a través de la formación de radicales Mn^{+3} a partir del Mn^{+2} . El Mn^{+3} se estabiliza formando quelatos con ácidos carboxílicos (ej. oxálico, malónico, málico,

tartárico, láctico) que actúan como mediadores difusibles de baja masa molecular eliminando electrones e hidrógenos inespecíficamente a moléculas orgánicas (Hofrichter, 2002). Las LiPs pueden ejercer por sí mismas la acción oxidativa o formar radicales libres a partir de algunos compuestos orgánicos como el alcohol veratrílico o el dimetoxibenceno de manera análoga a como ocurre con las MnP (Cameron et al., 2000). Estos radicales libres, son sustancias altamente oxidantes que pueden difundir y penetrar en matrices en las que las propias enzimas (MnP y LiP) no lo pueden hacer y así aumentar la biodisponibilidad de sustratos y xenobióticos implicados en este tipo de metabolismo microbiano. La versátil peroxidasa, uno de los tipos de enzimas que junto a la LiP y MnP conforman el grupo de las peroxidases de clase II, es una enzima modificadora de la lignina, de alto potencial redox, que se presenta como un híbrido estructural de la MnP y LiP (Hofrichter et al., 2010). Esto es, la VP tiene propiedades de la MnP debido a que puede oxidar los sustratos de esta enzima, pero también es responsable de oxidaciones de aminas simples y monómeros fenólicos independientemente de Mn^{2+} que la MnP no es capaz de oxidar (Martínez, 2002; Ruiz-Dueñas et al., 2009), y por otra parte puede oxidar también los sustratos de la LiP pero es más estable en la oxidación de compuestos fenólicos que la LiP (Ruiz-Dueñas et al., 2008). En los últimos años han sido descritas otras peroxidases híbridas de clase II como las conocidas bajo el nombre de VP-pequeñas. Estas contienen el sitio de unión al Mn^{2+} pero les falta el residuo triptófano; en consecuencia no son capaces de oxidar el veratril alcohol tal como lo hace la LiP, pero comparten con la VP la capacidad de oxidar fenoles, independientemente de la presencia de Mn^{2+} , propiedad que comparten con la MnP (Hofrichter et al., 2010). Las DyPs representan una nueva familia de hemo peroxidases identificadas en hongos. Estas enzimas oxidan varios colorantes, en particular los xenobióticos derivados de antraquinonas, así como también sustratos típicos de las peroxidases tales como fenólicos y ABTS (Sugano, 2009; Sugano et al., 2009). Esta capacidad para oxidar colorantes sintéticos del tipo antraquinona, de alto potencial redox que apenas pueden ser oxidados por otras peroxidases, es un rasgo característico de todas las peroxidases de tipo DyP estudiadas hasta ahora (Kim y Shoda, 1999).

Por su parte, la lacasa es una enzima fenol oxidasa con cobre, éste conforma su centro activo que es oxidado por el oxígeno o por un compuesto aromático, para generar un intermediario deficiente en un par de electrones. Dicho componente será oxidado nuevamente por oxígeno o por sustratos fenólicos, completándose el ciclo con cuatro

oxidaciones posteriores, tras lo cual la enzima vuelve a su estado relajado (Leonowitz et al., 1999).

El patrón de actividad de estas enzimas es específico del género y especie de hongo de pudrición blanca involucrado, algunos excretan LiP, MnP y no lacasa o MnP, lacasa y no LiP (Leonowicz et al., 1999; Pointing, 2001).

En el último tiempo se han reconocido cada vez más las ventajas de las enzimas como catalizadores en síntesis químicas. Estas hacen las reacciones químicas posibles en condiciones suaves, bajo condiciones medioambientalmente amigables en mezclas de reacciones acuosas y en su mayoría, muestran especificidad y selectividad que no puede lograrse por métodos químicos tradicionales. Por lo tanto, ciertas enzimas catalizan transformaciones regio-y estereoselectivamente que conducen a productos útiles como es el caso de los productos farmacéuticos o productos químicos finos (Hofrichter y Ullrich, 2006).

Se ha comprobado que numerosas especies lignolíticas son capaces de degradar compuestos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, cloroanilinas, nitrotoluenos, bencenos policlorados y tinturas industriales, todos ellos contaminantes ambientales producidos en grandes cantidades por la industria (Blanquéz et al., 2008; Hawari et al., 1999; Johannes y Majcherczyk, 2000; Kokol et al., 2007; Nilsson et al., 2005; Ortega-Clemente et al., 2009; Pointing, 2001; Teeri, 2004; Wesenberg et al., 2003).

Existen numerosas técnicas fisicoquímicas de descontaminación. Sin embargo, no todas resultan eficientes para degradar totalmente los contaminantes y suelen ser costosas. La biorremediación es el uso de agentes biológicos, esencialmente microorganismos, para eliminar o reducir la concentración de sustancias tóxicas presentes en un sitio o material contaminado. Se presenta como una alternativa viable y económica frente a los métodos clásicos de descontaminación, ya que con frecuencia la biodegradación conduce hasta productos inocuos (principalmente CO₂ y H₂O; y además Cl⁻ en el caso de fenoles clorados). La degradación de compuestos aromáticos ha sido estudiada exhaustivamente en bacterias, pero solo un número reducido de estas investigaciones se llevó a cabo con hongos. A partir de la década de los 80 se ha incrementado el interés acerca de la posibilidad de usar en biorremediación hongos de pudrición blanca de la madera. Los hongos causantes de pudrición blanca presentan una serie de ventajas no asociadas a otros sistemas de biorremediación: a- No requieren preacondicionamiento al contaminante, b- Las enzimas lignolíticas se secretan extracelularmente, no siendo necesario el contacto entre la hifa y el compuesto contaminante, c- Las enzimas

lignolíticas tienen un amplísimo rango de compuestos contaminantes como sustratos, d- Pueden tolerar ambientes que contengan metales tóxicos y adsorberlos contribuyendo a la detoxificación (Baldrian y Gabriel, 2003; Barr y Aust, 1994). Esto ha llevado a intentar la utilización de estos hongos en biorremediación. Cepas de *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* han sido utilizadas en detoxificación de suelos in situ y en biorreactores para la decoloración de efluentes coloreados industriales (Wesenberg et al., 2003).

El primer estudio de degradación de compuestos aromáticos por hongos fue llevado a cabo en 1985 por Bumpus et al, utilizando el hongo *P. chrysosporium*. Este hongo es capaz de, degradar, adsorber y detoxificar efluentes conteniendo clorofenoles (Aranda et al., 2006; Duran et al., 2002; García et al., 2000; Mathialagan y Viraraghavan, 2009; Valli y Gold 1991; Wu y Yu, 2007). Dada su capacidad para degradar clorofenoles, algunas potenciales aplicaciones de *P. chrysosporium* han sido exploradas: ej. la detoxificación y decoloración de efluentes de la industria papelera o el tratamiento de suelos contaminados con residuos de la industria de preservantes de madera (Paszczynski y Crawford, 1995). Sin embargo hasta el presente sólo un par de compañías han incorporado hongos ligninolíticos en biorremediación de suelos en sus programas: ej. "EarthFax Development Corp." en Estados Unidos o "Gebruder Huber Bodenrecycling" en Alemania (Magan et al., 2010).

Existen diversos factores que afectan la degradación fúngica de contaminantes. Los mismos se pueden dividir en dos grupos: los relacionados con las condiciones necesarias para el crecimiento y la síntesis de enzimas lignolíticas, ya que los títulos de enzimas extracelulares constituyen un importante factor para asegurar altas tasas de degradación, especialmente en medios líquidos (Novotný et al., 2004); y por otro lado las relacionadas con las características de los efluentes industriales a tratar (xenobióticos presentes en el efluente, concentración y toxicidad de los mismos, fuerza iónica, temperatura, pH, presencia de surfactantes y de metales pesados), que afectan tanto la biodegradación enzimática como la capacidad de adsorción de los colorantes por la biomasa fúngica (Fu y Viraraghavan, 2001).

Los hongos causantes de pudrición blanca pueden ser cultivados a escala industrial para la producción de ligninasas (Aidoo et al., 1982; Pandey et al., 2000) y posteriormente emplear las mismas para diversos fines. De ahí que se presentan como organismos promisorios para el estudio de su fisiología y capacidad de biorremediación.

Sin duda, uno de los grandes retos de la humanidad en este inicio del siglo XXI es el de convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes energéticamente. Por otro lado, se requiere tener la capacidad tecnológica para restaurar los sitios dañados ambientalmente. La biotecnología tiene un papel importante que desempeñar en esta transformación tecnológica. La investigación deberá estar enfocada en la utilización de nuevas herramientas biotecnológicas para la prevención, control y remediación de las contaminaciones ambientales (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

En el presente trabajo de tesis se exponen los resultados de los ensayos realizados con un hongo de pudrición blanca: *T. versicolor* cepa BAFC 2234, aislada en Argentina. La información que aquí se detalla se ha organizado en cinco capítulos; el corriente se presenta a modo de introducción y en los cuatro siguientes se desarrollan en forma pormenorizada distintos ensayos realizados con la mencionada cepa. Cada capítulo se encuentra estructurado en distintas secciones, que incluyen en líneas generales: la presentación de un marco teórico y los objetivos planteados, la metodología empleada, el desarrollo de los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, cerrando cada uno con una conclusión.

En el capítulo 2 se muestran los pasos llevados a cabo para la selección de la cepa objeto de estudio, así como también el uso de fenol como única fuente de carbono. En el capítulo 3 se especifican los pasos implementados para el escalado de la producción de enzimas lignolíticas por *T. versicolor* y la purificación de las enzimas secretadas en el medio de cultivo oportunamente escogido. A lo largo del capítulo 4 se detallan los ensayos de remoción de fenol y nitrofenol in-vivo e in-vitro así como también la remoción de los mismos con el hongo inmovilizado en distintos soportes. Finalmente en el capítulo 5 se muestran los resultados de ensayos realizados con esta cepa durante la decoloración de la tintura industrial Azure B y del residuo de la industria papelera conocido como licor negro.

CAPITULO 2

Relevamiento de cepas

1 Antecedentes

Los hongos de pudrición blanca producen enzimas lignolíticas que les confieren un enorme potencial de biorremediación (Pointing, 2001). Estas enzimas, debido a su naturaleza extracelular, evitan la necesidad de internalizar los substratos y permiten que aquellos de baja solubilidad sean oxidados. En consecuencia, este sistema enzimático les permite tolerar una mayor concentración de contaminantes tóxicos (Reddy y Mathew, 2001).

Los compuestos fenólicos son un grupo de moléculas orgánicas cuyo uso masivo industrial condujo a la contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres, resultando en su clasificación como contaminantes prioritarios (Valli y Gold, 1991). Tanto el fenol, como los fenoles sustituidos, se encuentran entre los contaminantes de mayor toxicidad presentes en efluentes industriales; resultando tóxicos a concentraciones relativamente bajas. Algunos han sido descritos también como carcinógenos humanos (Verschueren, 1977). Debido a sus efectos tóxicos están clasificados entre las sustancias más peligrosas de acuerdo a US EPA. La importancia de su remoción antes de la descarga en un cuerpo de agua, deviene de su toxicidad para los organismos acuáticos (Villalobos y Buchanan, 2001; Nair et al., 2008).

La biorremediación es el uso de agentes biológicos, esencialmente microorganismos, para eliminar o reducir la concentración de sustancias tóxicas presentes en un sitio o material contaminado. Se presenta como una alternativa viable y económica frente a los métodos clásicos de descontaminación. Implica el uso de microorganismos naturales o introducidos para degradar, transformar o remover compuestos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos, proporcionando una solución eficiente y económicamente atractiva (Bumpus et al., 1985). Dentro de estos organismos, los hongos causantes de pudrición blanca muestran un gran potencial para su utilización en biorremediación.

Desde 1985, momento en el que se llevó a cabo el primer estudio de degradación en hongos, numerosas investigaciones a nivel mundial se han orientado a elucidar el potencial de hongos de pudrición blanca en biorremediación. Las tres principales enzimas involucradas en la degradación de lignina son las lacasas, lignina peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs). Algunos hongos de pudrición blanca producen las tres clases, mientras que otros producen diferentes combinaciones de las mismas.

Lacasas (bencenodiol oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas glicosiladas que contienen cobre en su sitio activo y que catalizan la reducción de cuatro electrones del dióxígeno del agua, por moléculas de sustrato de origen fenólico, sin la generación de H₂O₂. LiPs (EC 1.11.1.7) son proteínas extracelulares, hemo glicosiladas que catalizan la oxidación dependiente de H₂O₂ de un electrón de compuestos aromáticos relacionados con la lignina a radicales catiónicos arilo, conduciendo a una variedad de productos finales. MnPs (EC 1.11.1.7) son hemoproteínas glicosiladas extracelulares, que catalizan la oxidación dependiente de H₂O₂ de Mn²⁺ a Mn³⁺. Es el estado Mn³⁺ de la enzima el que realmente media la oxidación de sustratos fenólicos, mientras que compuestos no fenólicos son oxidados vía radicales catiónicos (Reddy y Mathew, 2001). Junto a estas enzimas existen otras oxidasas extracelulares, tales como la glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987) y la aril alcohol oxidasa (Guillén y Evans, 1994) que producen el peróxido de hidrógeno requerido por las peroxidasas antes mencionadas, siendo el peróxido el oxidante primario y la acción de las mencionadas enzimas dependiente del mismo. Además de la LiP y MnP dentro de las enzimas lignolíticas hemo peroxidasas producidas por los hongos de la podredumbre blanca, se encuentra la versátil peroxidasa mencionada en el capítulo anterior (Hammel y Cullen, 2008). La VP se define por su capacidad para oxidar los sustratos típicos de otras peroxidasas, siendo estos: el Mn²⁺, sustrato de la MnP, el veratril alcohol, sustrato típico de la LiP y los fenoles simples, que son los sustratos de la peroxidasa de *Coprinopsis cinerea*. Estudios cinéticos demostraron que estas propiedades "híbridas" se deben a la coexistencia en una única proteína de diferentes sitios catalíticos que recuerdan a los presentes en las otras familias peroxidasas. Dentro de las diferentes peroxidasas producidas por basidiomicetes, la VP presenta particular interés debido a su versatilidad catalítica, incluyendo la degradación de compuestos que otras peroxidasas no pueden oxidar directamente (Ruiz-Dueñas et al., 2009).

Dada la variabilidad existente en la capacidad degradativa de las diferentes especies y aún entre cepas fúngicas, resultan de suma importancia los relevamientos en búsqueda de microorganismos capaces de ser empleados en la degradación y detoxificación de fenoles y derivados (Santos y Linardi, 2004).

Por otra parte, cada cepa fúngica tiene requerimientos especiales, es así que los primeros pasos en la generación de un eficiente proceso fúngico de biorremediación, son la identificación de un organismo adecuado y la optimización de las condiciones de

cultivo necesarias para su rápido crecimiento y la producción de enzimas relevantes (Ryan et al., 2007).

Objetivos:

Objetivo general:

-Seleccionar cepas nativas de hongos causantes de pudrición blanca eficientes productoras de enzimas lignolíticas, para estudiar su potencial aplicación en la degradación de compuestos fenólicos.

Objetivos específicos:

-Evaluar la tolerancia de aislamientos nativos de hongos causantes de pudrición blanca de reconocida eficiencia en la producción de enzimas lignolíticas para crecer en medios con distintas concentraciones de fenol y otros compuestos fenólicos.

-Evaluar la capacidad de estos hongos para utilizar fenol como única fuente de carbono.

-Evaluar la capacidad de cepas seleccionadas en base a los ensayos anteriores para degradar compuestos fenólicos.

-Evaluar la cinética de crecimiento y producción de enzimas lignolíticas en medio líquido de la/s cepas seleccionadas y evaluar modificaciones al medio de cultivo para incrementar la producción de estas enzimas y la eficiencia de degradación.

2 Materiales y métodos

2.1 Cepas

Para la realización del presente relevamiento se emplearon 25 cepas de hongos nativos de Argentina pertenecientes al cepario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (BAFC), 20 de ellas agrupadas en los géneros: Fomes, Phanerochaete, Coriolus, Pycnoporus, Irpex, Abortiporus, Schizophora, Trametes, Aurantiporus, Ganoderma, Lenzites, Phlebia y Coriolopsis; y las restantes 6 además

productoras de carpóforos comestibles pertenecientes a los géneros *Pleurotus*, *Flammulina*, *Lentinula* y *Lentinus*. Se compararon con una cepa de *P. chrysosporium* (BKM-F-1767) de reconocida eficiencia lignolítica (Rodríguez et al., 1999). Los hongos fueron mantenidos en tubos pico de flauta con agar (2%) y extracto de malta (1.2%) a 4°C (Los nombres completos de las especies se encuentran en la Tabla 1).

2.2 Selección de cepas tolerantes a distintas concentraciones de fenol

La tolerancia al fenol (C_6H_5OH) se evaluó usando un método que involucra la determinación de la tasa de crecimiento de cada cepa en placa (Fig. 1). Los organismos en estudio fueron inoculados en cajas de Petri con medio sintético glucosa-asparagina (GA) agarizado: glucosa, 10 g; asparagina monohidrato, 4 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; H_2KPO_4 , 0.5 g; HK_2PO_4 , 0.6 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.4 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.09 mg; H_3BO_3 , 0.07 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.02 mg; $FeCl_3$, 1 mg; $ZnCl_2$, 3.5 mg; tiamina, 0.1 mg; biotina, 0.05 mg; agar, 20 g; agua destilada hasta 1 l (pH final: 6.5), suplementado con distintas concentraciones de fenol hasta 10 mM (960 ppm). El medio se autoclavó a 121°C durante 20 min y las fuentes fenólicas se esterilizaron por filtración y agregaron estérilmente al medio. Como inóculo se utilizó un taco de agar de 25 mm² obtenido del borde de las colonias de 7 días de desarrollo en el mismo medio.

Las cajas de Petri se incubaron a 28°C por 28 días. Se evaluó la tasa de crecimiento midiendo el diámetro de las colonias a intervalos de tres días y luego calculándose la velocidad de crecimiento (mm.día⁻¹). Como control se sembró al hongo en las mismas condiciones pero sobre medio GA sin fenol. Cada cepa se evaluó por triplicado en las concentraciones de fenol 1, 5, 7.5 y 10 mM. Se registró también la presencia de un halo de color castaño alrededor del inóculo, indicativo de la actividad de oxidasas y peroxidasas extracelulares (Papinutti y Forchiassin, 2000). En forma adicional, en los cultivos con concentraciones 7.5 mM de fenol, se tomaron muestras para determinar la actividad lacasa. Para ello, tacos de agar con micelio (25 mm²) se mezclaron con agua destilada (50:50 v/v), siendo luego centrifugados (10.000 × g por 8 min) y la actividad enzimática determinada en el sobrenadante.

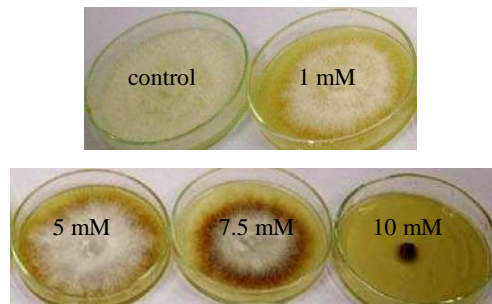
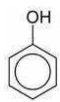


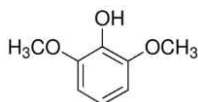
Fig. 1: Cultivo de *Irpex lacteus* en placa, en medio GA suplementado con distintas concentraciones de fenol

2.3 Relevamiento de la capacidad para crecer en presencia de otras fuentes fenólicas

Entre las cepas evaluadas en el punto anterior, se seleccionaron aquellas capaces de crecer en la concentración más elevada de fenol (10 mM). Estas fueron luego cultivadas en medio GA suplementado con otras fuentes fenólicas: 2,6-dimetoxifenol, ácido gálico, 2,4-diclorofenol y guayacol (2-metoxifenol), en una concentración final 7.5 mM. En las mismas cepas se ensayó además la capacidad para crecer en medio sólido con fenol como única fuente de carbono. Esta evaluación se hizo utilizando medio GA modificado, donde la asparagina se reemplazó por fosfato de amonio (4 g l^{-1}) y la glucosa por fenol (5 mM).



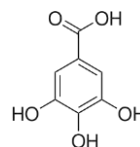
fenol



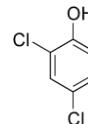
2,6-dimetoxifenol



guayacol



ácido gálico



2,4-diclorofenol

2.4 Cultivo en medio líquido

Las cepas que resultaron más eficientes en la remoción de fenol, fueron luego cultivadas en medio líquido GA suplementado con fenol (5 mM) (Fig. 2) y medio con fenol como única fuente de carbono (5 mM) y fosfato de amonio (4 g l⁻¹) en lugar de asparagina. Como controles se emplearon respectivamente medio GA sin fenol y medio GA modificado donde se reemplazó el fenol por glucosa (concentración 0.9 g.l⁻¹ y la asparagina por fosfato de amonio (4 g l⁻¹)). El cultivo fue realizado en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 30 ml de medio. La incubación se llevó a cabo a 28°C en condiciones estáticas. Muestras en esterilidad fueron tomadas a intervalos de 7 días hasta el día 28 de crecimiento. Finalizado el cultivo se separó el micelio por filtración a presión reducida y el sobrenadante de cultivo fue conservado a -4°C para posteriores determinaciones. El crecimiento fue cuantificado a partir del peso del micelio, luego de secarlo a 70°C durante 48 hs.



Fig. 2: Cultivo de *T. versicolor* en medio líquido GA (der.) y medio GA suplementado con fenol 5 mM (izq.)

2.5 Actividades enzimáticas

La actividad lacasa (E.C:1.10.3.2) se determinó por oxidación del sustrato ABTS (2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (Bourbonnais et al., 1995). La reacción se realizó a 30°C, en buffer acetato de sodio (pH 3.5). Se registró el incremento de absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad manganeso peroxidasa (MnP) (E.C:1.11.1.13) se valoró usando como sustrato rojo fenol en buffer succinato (pH 4.5) a 30°C (Glenn y Gold, 1985). Se registró el incremento de absorbancia a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad enzimática (UE) se define como la cantidad de

enzima que se requiere para oxidar un μmol de sustrato por minuto, la actividad enzimática se expresa en UE por litro de medio líquido.

2.6 Cuantificación de fenoles remanentes

En todos los casos valoró espectrofotométricamente la concentración de fenoles remanente, siguiendo la técnica de Folin Ciocalteau (Vazquez Roncero et al., 1974). La mezcla de reacción consistió en 2.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteau (1:10), 0.5 ml de muestra y 2 ml de Na_2CO_3 (7.5%). Se incubó a 45°C por 10 min. La absorbancia se leyó a 765 nm y comparó con una curva patrón realizada con ácido gálico.

2.7 Análisis estadísticos

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se expresaron como valores medios con la desviación estándar (SD); los análisis de varianza se llevaron a cabo utilizando el programa ANOVA seguido por el test de Tukey utilizando el programa Statistica 7.0. Se consideraron significativas las diferencias en $p < 0.05$.

3 Resultados

3.1 Selección de cepas

Las 26 cepas de hongos evaluadas crecieron en las concentraciones 1 mM y 5 mM de fenol, 21 de ellas lo hicieron también en la concentración 7.5 mM y sólo 10 mostraron crecimiento en 10 mM de fenol. A partir de los resultados obtenidos (Tabla 1), se observa que aun el fenol 1 mM afecta significativamente la velocidad de crecimiento de algunas de las cepas evaluadas (reduce hasta el 85% la velocidad de crecimiento en el caso de *Trametes trogii*), lo que es indicativo del fuerte efecto inhibitorio del fenol. Sólo las cepas más resistentes pudieron desarrollarse en concentraciones tan altas como 7.5 y 10 mM, interesantemente *P. chrysosporium* no fue una de ellas.

De las 10 cepas que crecieron en la concentración 10 mM, *Irpex lacteus*, *Lenzites elegans*, *Schizophora paradoxa*, *T. versicolor*, *Phanerochaete sordida*, *Lentinus tigrinus* y *Lentinus lindquistii* fueron las que alcanzaron mayor diámetro en sus colonias, sugiriendo una mayor tolerancia al fenol. Además, todas ellas mostraron halos de coloración en las mayores concentraciones, lo que indicaría la presencia de actividad oxidasa y peroxidasa. Seis cepas (entre ellas *T. versicolor*) demostraron una velocidad de crecimiento correspondiente a un 45-50% de la que desarrollaron en ausencia de fenol. Si bien *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126, *I. lacteus* BAFC 1171 y *Trametes villosa* BAFC 2755 también crecieron en esta concentración, su desarrollo fue limitado (Tabla 1).

Se midió actividad lacasa extracelular en extractos obtenidos a partir de tacos de agar cubiertos por micelio obtenidos de las colonias crecidas 28 días en medio GA suplementado con fenol 7.5 mM. Seis especies reconocidas como potentes agentes de pudrición blanca no exhibieron actividad lacasa bajo estas condiciones (*Flammulina velutipes*, *I. lacteus*, *Lentinula edodes*, *L. elegans*, *Abortiporus biennis* y *Phlebia brevispora*). Los mayores títulos de lacasa se detectaron en *Pleurotus djamor*, *Ganoderma resinaceum* y *Coriolopsis gallica* (alrededor de 35 mU g⁻¹), pero ninguna de estas cepas fue capaz de crecer en presencia de fenol 10 mM.

Siete cepas se seleccionaron en base a su tolerancia al fenol para un segundo ensayo en el que se evaluó su capacidad para crecer en presencia de otros compuestos fenólicos. Fueron capaces de crecer en medios con 2,6-dimetoxifenol y ácido gálico (7.5 mM); y en medio con fenol como única fuente de carbono, demostrando su capacidad para degradarlo (Tabla 2). En este último medio, *I. lacteus* alcanzó la mayor velocidad de crecimiento.

Tabla 1: Relevamiento de la capacidad de crecimiento de cepas de hongos de pudrición blanca en cuatro concentraciones de fenol (1 a 10 mM). Actividad lacasa medida en la concentración 7,5 mM.

Cepa	Fenol					Lacasa ^b (mUg ⁻¹)
	Control ^a	1 mM	5 mM	7.5 mM	10 mM	
	Velocidad de crecimiento (mm día ⁻¹)					
<i>Corioliopsis floccosa</i> BAFC 2101	12.9±0.28	11.6±0.07	4.6±0.14	2.5±0.07	NC	14.7±0.07
<i>Coriolus antarcticus</i> BAFC 266	12.9±0.35	12.9±0.09	6.4±0.07	6.2±0.09	NC	22.2±0.63
<i>Flammulina velutipes</i> BAFC 1763	7.3±0.21	9.0±0.21	3.9±0.022	NC	NC	0
<i>Fomes fasciatus</i> BAFC 2752	9.0±0.07	5.4±0.14	3.0±0.08	0.5±0.06	NC	10.9±0.98
<i>Ganoderma resinaceum</i> BAFC 228	12.9±0.08	11.6±0.15	6.4±0.06	6.4±0.09	NC	34.2±0.64
<i>Abortiporus biennis</i> BAFC 74	12.9±0.07	12.9±0.28	3.1±0.23	NC	NC	0
<i>Irpex lacteus</i> BAFC 2598	12.9±0.21	12.9±0.14	9.0±0.05	6.4±0.05	5.6±0.08	1.8±0.14
<i>Irpex lacteus</i> BAFC 1171	12.9±0.34	9.0±0.22	5.4±0.15	2.6±0.07	1.8±0.07	0
<i>Lentinus lindquistii</i> BAFC 2102	12.9±0.08	9.0±0.28	6.4±0.09	6.4±0.21	6.4±0.06	6.2±0.15
<i>Lentinus tigrinus</i> BAFC 197	12.9±0.14	12.9±0.23	6.4±0.10	6.4±0.08	6.4±0.10	12.0±0.21
<i>Lentinula edodes</i> BAFC 3883	6.2±0.13	6.1±0.20	2.9±0.16	NC	NC	0
<i>Phlebia brevispora</i> BAFC 633	9.0±0.21	6.4±0.13	2.9±0.07	NC	NC	0
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKMF 1767	12.9±0.07	9.0±0.09	9.0±0.06	1.7±0.07	NC	1.6±0.20
<i>Phanerochaete sordida</i> BAFC 2122	12.9±0.14	12.9±0.06	6.4±0.07	6.4±0.08	6.4±0.14	12.3±0.22
<i>Pleurotus djamor</i> BAFC 215	9.0±0.07	6.4±0.07	2.8±0.08	2.1±0.14	NC	34.6±0.96
<i>Pleurotus ostreatus</i> BAFC 120	9.0±0.13	9.0±0.22	4.7±0.15	0.7±0.16	NC	11.9±0.28
<i>Pycnoporus sanguineus</i> BAFC 98	10.3±0.14	9.0±0.06	6.4±0.28	3.7±0.07	NC	3.9±0.13
<i>Pycnoporus sanquineus</i> BAFC 2126	12.9±0.22	9.0±0.23	6.4±0.07	4.1±0.12	1.3±0.08	19.0±0.07
<i>Schizophora paradoxa</i> BAFC 71	12.9±0.13	9.0±0.14	6.4±0.08	6.4±0.20	6.4±0.09	0.7±0.08
<i>Aurantiporus fissilis</i> BAFC 170	9.0±0.23	9.0±0.20	6.0±0.06	3.2±0.08	NC	1.1±0.29
<i>Lenzites elegans</i> BAFC 2127	12.9±0.09	12.9±0.07	9.0±0.22	6.4±0.07	3.1±0.05	0
<i>Corioliopsis gallica</i> BAFC 270	6.4±0.07	4.2±0.21	3.4±0.08	1.8±0.09	NC	34.1±0.35
<i>Trametes trogii</i> BAFC 463	90.0±0.18	9.0±0.23	2.7±0.14	1.1±0.07	NC	23.9±0.92
<i>Trametes trogii</i> BAFC 619	16.0±0.14	2.3±0.14	3.0±0.07	1.7±0.14	NC	14.5±0.35
<i>Trametes versicolor</i> BAFC 2234	12.9±0.12	12.9±0.15	6.4±0.14	6.4±0.09	6.4±0.08	13.3±0.28
<i>Trametes villosa</i> BAFC 2755	12.9±0.11	9.0±0.25	6.4±0.09	4.9±0.15	1.4±0.16	14.0±0.84

^a Control (sin agregado de fenol)

^b La actividad lacasa se midió por oxidación del ABTS a pH 4.5 luego de 28 días de incubación

NC: No creció

Entre todas las cepas evaluadas, *I. lacteus*, *L. tigrinus* y *T. versicolor* alcanzaron la mayor tasa de crecimiento en las cuatro concentraciones de fenol utilizadas. Sólo crecieron en medio con guayaquil *T. versicolor*, *L. lindquistii*, *L. tigrinus* e *I. lacteus*,

alcanzando *T. versicolor* la mayor velocidad de crecimiento. El 2,4-diclorofenol resultó inhibitorio del crecimiento en todos los casos (Tabla 2).

Tabla 2: Evaluación de la capacidad de crecimiento de hongos de pudrición blanca en medio GA agarizado con el agregado de distintas fuentes fenólicas (7.5 mM) o en un medio con fenol (5 mM) como única fuente de carbono y sulfato de amonio (4 g l⁻¹) como fuente de nitrógeno

Cepa	Velocidad de crecimiento (mm día ⁻¹)				
	Acido gálico	2,6-Dimetoxifenol	Guayacol	2,4-Diclorofenol	Fenol
<i>Irpex lacteus</i> BAFC 1171	12.2±0.35 ^a	12.4±0.15 ^a	0.6±0.05 ^c	NC	1.2±0.11 ^{a,b}
<i>Lentinus tigrinus</i>	12.6±0.28 ^a	12.3±0.13 ^a	2.7±0.12 ^b	NC	0.8±0.05 ^{b,c}
<i>Lentinus lindquistii</i>	12.5±0.22 ^a	12.4±0.14 ^a	2.4±0.10 ^b	NC	0.8±0.10 ^{b,c}
<i>Phanerochaete sordida</i>	12.4±0.15 ^a	12.1±0.25 ^a	NC	NC	0.9±0.08 ^{b,c}
<i>Schizopora paradoxa</i>	12.4±0.12 ^a	12.2±0.15 ^a	NC	NC	1.1±0.09 ^b
<i>Lenzites elegans</i>	12.5±0.25 ^a	12.4±0.21 ^a	NC	NC	0.9±0.07 ^{b,c}
<i>Trametes versicolor</i>	12.8±0.22 ^a	12.6±0.25 ^a	6.4±0.15 ^a	NC	1.4±0.11 ^a

^a Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) se indican mediante diferentes letras superscriptas

^b NC: no creció

En base a los resultados evaluados, las cepas *T. versicolor* BAFC 2234 y *L. tigrinus* BAFC 197 fueron escogidas por su tolerancia para crecer en presencia de guayacol y particularmente por su habilidad para utilizar el fenol como única fuente de carbono. Dado su potencial, estas cepas resultan las más promisorias para emplearse en la biorremediación de compuestos fenólicos y serán estudiadas a fin de comprender los mecanismos de degradación.

3.2 Cultivo en medio líquido

El agregado de fenol (5 mM) al medio de cultivo GA no afectó el crecimiento de los hongos evaluados. *T. versicolor* alcanzó el pico de crecimiento al día 14 en el medio con fenol y en el control, siendo este crecimiento equivalente (4.01 en medio GA y 4.44

mg.ml⁻¹ en GA+fenol). Por su parte *L. tigrinus* alcanzó el mayor crecimiento en el día 21, también en forma equivalente en ambos medios de cultivo (3.96 en GA y 4.38 mg.ml⁻¹ en GA+fenol). Ambas cepas fueron capaces de transformar el fenol siendo su remoción más rápida en los primeros días en cultivos de *T. versicolor*. Esta cepa resultó además la mayor productora de lacasa. Los máximos registrados respectivamente para lacasa en *T. versicolor* y *L. tigrinus* fueron 4.1 y 0.3 U.ml⁻¹; mientras que para MnP 0.03 y 0.01 mU.ml⁻¹. Al final del periodo de evaluación, ambos hongos removieron el fenol en forma equivalente. Se evaluó también la capacidad de ambas cepas de utilizar al fenol (5 mM) como única fuente de carbono. Ambos hongos lo removieron completamente al cabo de 28 días de cultivo. *T. versicolor* alcanzó una mayor biomasa final 1.67 mg.ml⁻¹ respecto de 0.80 mg.ml⁻¹ en *L. tigrinus*; así como mayores títulos enzimáticos. Máximos registrados respectivamente para lacasa en *T. versicolor* y *L. tigrinus* 0.38 y 0.2 U.ml⁻¹, en el caso de MnP sólo fue producida por *T.versicolor* (0.01 mU.ml⁻¹) (Figs. 3 y 4). A los 28 días de cultivo, el crecimiento registrado de *T. versicolor* en medio con fenol fue de 1.67 mg.ml⁻¹ y en el medio control con una concentración equivalente de carbono, provista por glucosa (0.9 g.l⁻¹) fue de 1.14 mg.ml⁻¹. En *L. tigrinus* no se detectaron diferencias al día 28 de cultivo, siendo el crecimiento en el medio control con glucosa similar al obtenido en el medio con fenol (0.73 y 0.80 mg.ml⁻¹ respectivamente).

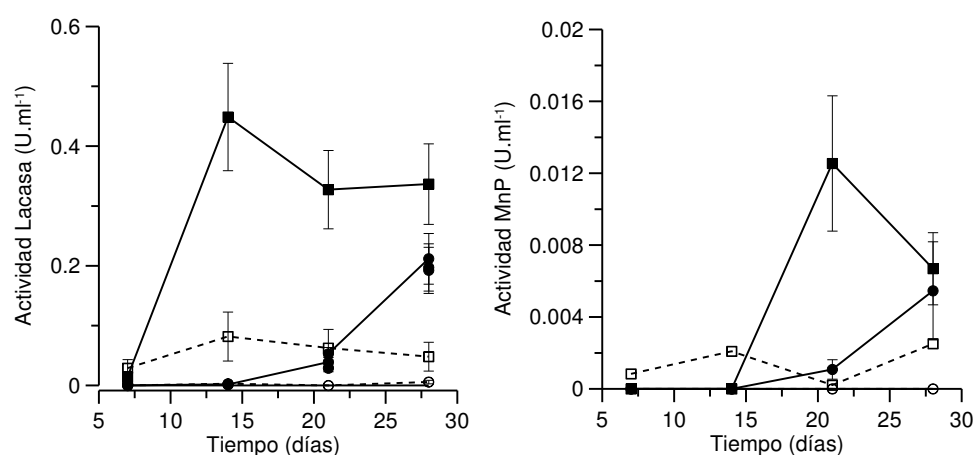


Fig. 3: Actividades lacasa (izq.) y MnP (der.) (U.ml⁻¹) en medio de cultivo con fenol como única fuente de carbono. Círculos *L. tigrinus*, cuadrados *T. versicolor*; línea punteada controles.

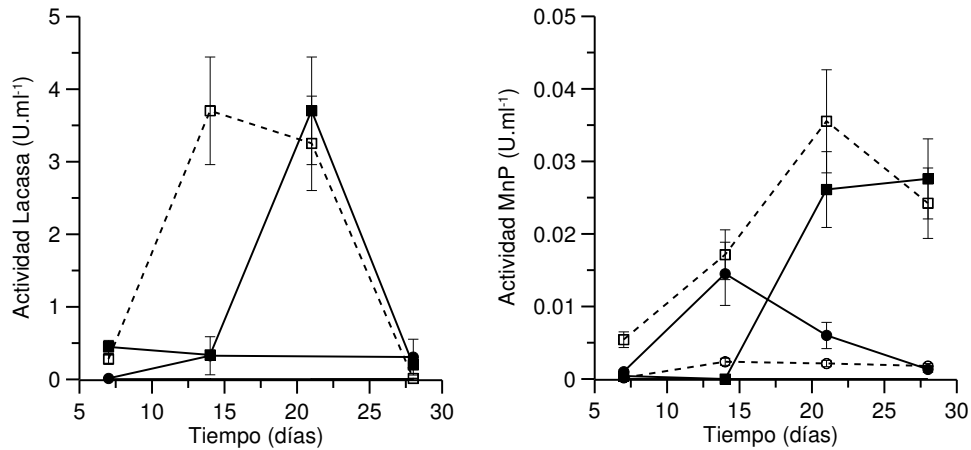


Fig. 4: Actividades lacasa (izq.) y MnP (der.) (U.ml⁻¹) en medio de cultivo GA suplementado con fenol (5 mM). Círculos *L. tigrinus*, cuadrados *T. versicolor*; línea punteada controles.

4 Discusión

Los primeros pasos para la generación de un proceso eficiente de biorremediación fúngica, consisten en la identificación de microorganismos apropiados y la optimización de las condiciones de cultivo necesarias para su rápido crecimiento y la producción de enzimas relevantes (Ryan et al., 2007). Con este propósito, 25 cepas argentinas de hongos causantes de pudrición blanca fueron evaluadas con respecto a su tolerancia al fenol durante el crecimiento en placa. En estudios de degradación de compuestos fenólicos, Santos y Linardi (2004) hallaron que el grado de degradación de fenol y el tiempo requerido, depende no sólo de la cepa empleada sino también de la concentración inicial de fenol en el medio de cultivo. El efecto tóxico de compuestos químicos del tipo de los clorofenoles, cresoles, etc., puede cuantificarse evaluando su efecto sobre el crecimiento y la capacidad de detoxificación en hongos de pudrición blanca (Bollag et al., 1988). Ryan et al. (2007) encontraron que la adición de este tipo de compuestos en los medios de cultivo de *T. versicolor* alarga la fase lag e inhibe el crecimiento a concentraciones superiores a los 2 mM. Por otra parte, es importante destacar que se presentan diferentes respuestas entre cepas de la misma especie y entre especies del mismo género; lo cual sugiere la existencia de diferencias fisiológicas entre las mismas. En estudios previos que evaluaron la capacidad de degradación de colorantes en placa por hongos de pudrición blanca, también se encontraron diferencias

entre los halos de crecimiento y decoloración aún entre cepas de la misma especie (Freitag y Morrell, 1992; Levin et al., 1994).

Todas las cepas fueron capaces de crecer en las concentraciones más bajas de fenol. En diversas concentraciones y cepas fueron observados halos de color alrededor del inóculo. Estos halos, que varían en intensidad y diámetro, son producto de la reacción de oxidasas y peroxidasas con los compuestos del tipo fenólico, provocando en consecuencia, un cambio de color de los mismos (Papinutti y Forchiassin, 2000). Del total de cepas estudiadas, las 7 cepas seleccionadas y evaluadas posteriormente en otras condiciones de estrés, fueron capaces de crecer con fenol como única fuente de carbono. La degradación de lignina por hongos causantes de pudrición blanca es un proceso cometabólico que requiere de azúcares provenientes de las hemicelulosas o celulosa, como fuente de carbono; y el crecimiento de estos hongos utilizando mono-aromáticos como el fenol como fuente de carbono, ha sido raramente descrito (Yemendzhiev et al., 2008). En cambio basidiomycetes levaduriformes tales como *Trichosporum cutaneum* (Gaal y Neujahr, 1979) y *Rhodotorula mucilaginosa* (Cook y Cain, 1974) y también ascomycetes como *Penicillium frequentans* (Hofrichter y Fritsche, 1996) o *Aspergillus niger* (Jones et al., 1993) demostraron ser capaces de utilizar varios compuestos aromáticos, incluyendo alcoholes aromáticos relacionados con la lignina, aldehídos y ácidos, como única fuente de carbono y energía. Se caracterizaron en detalle las enzimas intracelulares relacionadas con la degradación de aromáticos en *T. cutaneum*: catecol 1,2-dioxigenasa y fenol hidroxilasa (Enroth et al., 1998; Neujahr y Gaal, 1973; Varga y Neujahr, 1970). Estas enzimas se encontraron recientemente en *T. versicolor* (Alexieva et al., 2010; Yemendzhiev et al., 2008), pero no se evaluaron en este trabajo.

Ninguna de las cepas resultó capaz de crecer en 2,4 diclorofenol. Este compuesto es uno de los clorofenoles más recalcitrantes, conocido por el efecto inhibitorio que ejerce sobre el crecimiento de distintas especies fúngicas tales como *Trichoderma viride*, *Mortierella isabellina*, y *Saprolegnia parasitica* (Baarschers et al., 1988).

Como resultado de los distintos relevamientos se seleccionaron dos cepas *T. versicolor* BAFC 2234 y *L. tigrinus* BAFC 197, dos miembros del grupo ecofisiológico de los hongos causantes de pudrición blanca, con reconocido potencial de biodegradación y biorremediación (Marco-Urrea et al., 2009; Covino et al., 2010; Lladó et al., 2013) para el estudio de degradación de fenol.

La transformación de fenol tiene lugar a través de la acción de una variedad de enzimas. Éstas pueden incluir oxigenasas, hidroxilasas, peroxidadas, tirosinasas y oxidasas. Dentro de ellas, las enzimas fenol hidroxilasa, catecol dioxigenasa, lacasa y MnP son las más comúnmente involucradas en el proceso de degradación (Santos y Linardi, 2004; Nair et al., 2008). A pesar de esto, en este trabajo no pudo establecerse una correlación entre la actividad lignolítica lacasa medida en medio sólido y la capacidad para crecer en el medio con fenol. Por el contrario si se observó una clara correlación entre la remoción de fenol en medio líquido y las actividades lacasa y MnP. Los picos de producción de enzimas fueron detectados en los días 14 y 21 de cultivo siendo la remoción completa de fenol al día 28. De las dos cepas cultivadas en medio líquido, *T. versicolor* resultó ser más eficiente en la remoción de fenol y produjo mayores títulos de ambas enzimas lignolíticas. *T. versicolor* es un hongo de pudrición blanca con reconocida capacidad ligninolítica, que ha demostrado en estudios previos su habilidad para degradar diversos compuestos fenólicos. Es reconocido por producir elevadas cantidades de lacasa (Jönsson et al., 1997). Además secreta varias peroxidadas tales como MnP y LiP, siendo éstas las mejor conocidas (Dodson et al., 1987; Johansson et al., 1993; Paice et al., 1993; Bourbonnais et al., 1995). Es debido a esto y a su reconocida capacidad degradativa, que ha sido empleado en la degradación de una amplia variedad de contaminantes tales como fenol, cresol (Ryan et al., 2007), triclorobenceno (Marco-Urrea et al., 2009), además de colorantes, clorofenoles y derivados fenílicos, entre otros (Grey et al., 1998; Yemendzhiev et al., 2008; Carabajal et al., 2012; Chakroun et al., 2012). *T. versicolor* fue capaz de utilizar también fenol y compuestos nitroaromáticos como única fuente de carbono (Yemendzhiev et al., 2008; 2011) y de reducir el color y compuestos aromáticos presentes en el licor negro (Font et al., 2003). También ensayos con sus enzimas purificadas han mostrado una exitosa remoción de pentaclorofenol en bajas concentraciones (Ullah y Evans, 1999).

5 Conclusiones

Estos resultados confirman la capacidad de la cepa seleccionada de *T. versicolor* para remover eficientemente al fenol, así como utilizarlo como única fuente de carbono. Sobre la base de estos resultados, la cepa investigada puede tener buenas perspectivas

para su aplicación en la detoxificación de las aguas residuales industriales contaminadas con fenoles.

CAPITULO 3

Escalado y purificación

1 Antecedentes

El análisis proteómico es una poderosa y moderna herramienta que permite proporcionar una comprensión sistemática de eventos a nivel molecular y clarificar de esta forma los mecanismos fisiológicos complejos y divergentes, involucrados en los procesos de degradación. Esto se define como la evaluación global de las proteínas celulares expresadas en un estado biológico particular (Kim et al., 2007). El término proteoma fue acuñado en 1994 para definir a todas las proteínas que son expresadas por un genoma en un tejido o en una célula. El proteoma de un organismo es un elemento altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular que se estudie y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente. En consecuencia, las condiciones de cultivo pueden influir en la expresión de proteínas. El análisis del proteoma extracelular puede ofrecer nuevas pistas, ya sea para la comprensión general de la degradación fúngica, como para potenciales aplicaciones industriales de las proteínas secretadas (Barreiro et al., 2011). La técnica empleada para el análisis de proteínas expresadas es la espectrometría de masas. Esta permite la identificación de proteínas, el conocimiento de su estructura primaria, la identificación de sus modificaciones post-traduccionales, y la cuantificación de la expresión proteínica. En forma resumida se describe a continuación la metodología empleada para el análisis proteómico de una muestra (Fig. 1). El primer paso consiste en la separación de las proteínas. Una muestra proveniente de un sistema biológico es una mezcla compleja de proteínas. Por lo tanto, las muestras se separan principalmente por técnicas cromatográficas y/o electroforéticas, las cuales constituyen tecnologías robustas, versátiles y con alta capacidad de resolución. Las más utilizadas son: electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) y bidimensional (2-D PAGE), electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico. Lo siguiente es el procesamiento de la muestra. El primer paso es la reducción de los puentes de disulfuro y la alquilación de las cisteínas. Tiene como objetivo desnaturalizar las proteínas permitiendo que se expongan los sitios específicos de corte enzimático y, a la vez, se evita la formación de dímeros. La muestra, reducida y alquilada, generalmente se digiere con tripsina (enzima que corta específicamente en los C-terminales de lisina y arginina, excepto cuando éstas son seguidas de prolina). Luego

se realiza el análisis por espectrometría de masas (EM). Este procedimiento involucra la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa, la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo a la relación de su masa con su carga eléctrica (m/z), utilizando campos electromagnéticos en el vacío. Los espectrómetros de masas poseen tres componentes básicos: un sistema de ionización, un analizador de masas y un detector de iones. Los analizadores de masas más usados son: tiempo de vuelo o TOF (time of flight), trampa de iones tridimensional o trampa de Paul o IT (ion trap), trampa de iones lineal o LIT (linear ion trap), quadropolo (Q), triplecuadropolo y FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance). Actualmente, debido al rápido desarrollo de la tecnología en el campo de la EM y de la proteómica, existen espectrómetros de masas que tienen más de un analizador de iones; éstos se denominan espectrómetros híbridos, como TOF-TOF, LIT-Orbitrap, LIT-ETD, LIT-FT-ICR, Q-TOF, LIT-triple quadropolo, etc. El cuarto paso es el análisis de datos. La interpretación de los espectros de masas constituye la parte más difícil de esta metodología. La identificación de proteínas a través de mapas peptídicos es la metodología más utilizada en los análisis proteómicos de los últimos años, principalmente debido a que la secuencia de una proteína es única y al ser cortada con una endoproteasa origina un patrón peptídico específico. Los valores exactos del conjunto de las masas moleculares de los péptidos es la representación única de una determinada proteína, ya que esta lista de masas moleculares está directamente relacionada con su estructura primaria. El espectro de masas evidencia la relación masa/carga (m/z) de los péptidos analizados y se convierte en una huella digital de la proteína analizada (mass finger printing). Esta lista de masas moleculares medidas por espectrometría de masas, es sometida a los programas de análisis proteómico (PROSPECTOR, MASCOT, ALDENTE, etc.) para su comparación con las diferentes proteínas de las bases de datos, las cuáles son digeridas in silico, generando una lista de masas teóricas. La comparación entre el listado de masas experimentales y teóricas es calificada por algoritmos específicos y a cada comparación se le asigna una calificación. Dependiendo de la exactitud y resolución de cada instrumento, sólo unos cuantos péptidos son necesarios para la identificación de la proteína en las bases de datos (Pando Robles y Ferreira Batista, 2007).

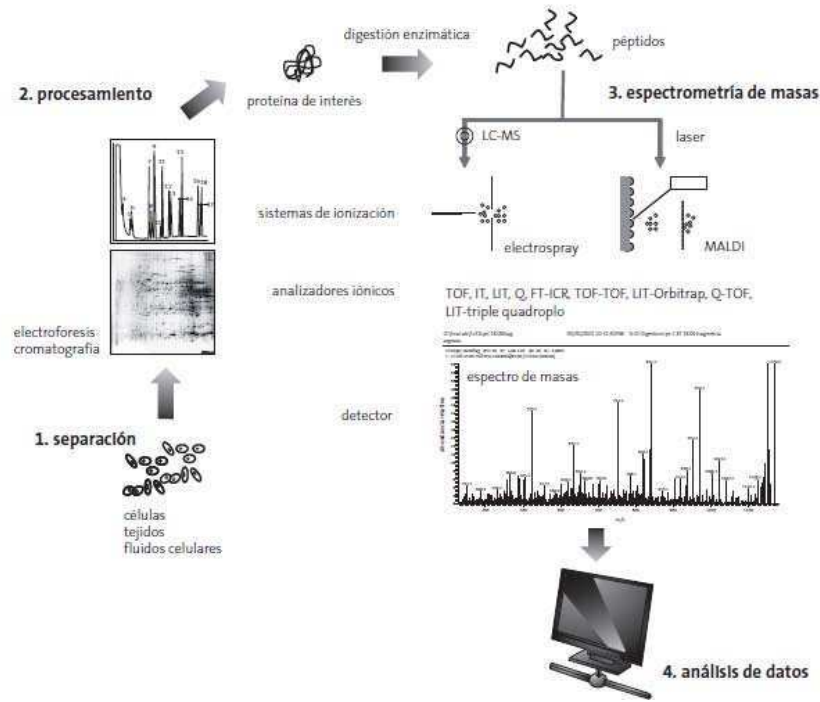


Fig. 1: Esquema resumido de la metodología para el análisis proteómico de una muestra (Pando Robles y Ferreira Batista, 2007).

Las enzimas fenoloxidasas y peroxidasas se encuentran entre las proteínas extracelulares más comúnmente secretadas por los hongos causantes de pudrición blanca. *T. versicolor* es un eficiente degradador de lignina y es conocido por secretar grandes cantidades de lacasa (Jönsson et al., 1997). Además, se ha demostrado que este hongo puede secretar varias peroxidasas, entre las más conocidas se encuentran la MnP y la LiP (Johansson et al., 1993). La versátil peroxidasa (VP, EC 1.11.1.16), es una enzima peroxidasa con capacidad lignolítica, que posee propiedades híbridas de MnP-LiP y es en consecuencia capaz de oxidar los sustratos típicos de la MnP (Mn^{2+}) y de la LiP (veratril alcohol) (Ruiz-Dueñas et al., 2001; 2009). Esta enzima es capaz de catalizar ambas reacciones por las dos siguientes razones: (i) por un lado presenta en su estructura un triptófano que media la transferencia electrónica y cumple la misma función catalítica que el presente en la lignina peroxidasa específica. La enzima es capaz de oxidar al alcohol veratrílico (a veratril aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP; (ii) por otro lado, también presenta un sitio compuesto por tres residuos ácidos para la unión del Mn^{2+} catalítico, propiedad exclusiva de las peroxidasas dependientes de Manganese, esto le permite oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} , y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de Mn^{2+} (Hammel y Cullen, 2008). El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP. Sus

características básicas son comunes a la mayoría de la peroxidasas. Sin embargo, la VP es única ya que es capaz de oxidar directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos, los cuales no son oxidados eficientemente por la LiP o la MnP en ausencia de veratril alcohol o Mn^{2+} , respectivamente. Incluso oxida colorantes de alto potencial redox, los cuales sólo son catalizados por la LiP en presencia de veratril alcohol (Heinfling et al., 1998). Para esta enzima, los pH óptimos para la oxidación de Mn^{2+} y sustratos aromáticos son diferentes. Para la oxidación de Mn^{2+} el óptimo es pH 5, mientras que para los compuestos aromáticos y colorantes es 3. Estos parámetros son similares a los de MnP y LiP, respectivamente. Son dos los sitios de unión a sustrato en las VPs de *Pleurotus eryngii*, y *Bjerkandera adusta*. Uno exclusivo para el Mn^{2+} , cerca del grupo hemo, y otro para los sustratos aromáticos en donde tiene un papel fundamental un triptofano superficial. El flujo de electrones desde el triptofano y el grupo hemo se ha demostrado en la VP de *P. eryngii* (Martínez, 2002) y se determinó para la VP de *B. adusta* (Pogni et al., 2005). Su estructura híbrida molecular, que proporciona múltiples sitios de unión, es la base para la oxidación de diferentes tipos de sustratos que abarcan una amplia gama de potenciales redox, incluyendo compuestos de bajo y alto potencial, así como también compuestos que otras peroxidasas no son capaces de oxidar eficientemente (por ejemplo el colorante Reactive Black 5). Esta peroxidasa fue primero observada en miembros de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* en 1999 y luego purificada, y posteriormente investigada (Camarero et al., 1999; Martínez, 2002; Ruiz-Dueñas et al., 2001; 2009). VP fue posteriormente detectada además en especies del género *Panus* (Lisov et al., 2007). A su vez, Kim et al. (2005) informaron la producción de VP por *T. versicolor*, pero hasta el momento no se tienen registros de que la enzima haya sido purificada en esta especie.

Objetivos:

- Investigar y determinar las condiciones fisiológicas que maximicen la producción de enzimas lignolíticas por *T. versicolor* BAFC 2234.
- Seleccionar un medio de cultivo apropiado para la obtención de sus enzimas lignolíticas e investigar y determinar las condiciones para el escalado del cultivo fúngico.
- Analizar el secretoma de *T. versicolor* BAFC 2234 creciendo en el medio de cultivo seleccionado empleando el enfoque proteómico.

2 Materiales y métodos

2.1 *Cepa fúngica*

La cepa de *T. versicolor* (BAFC 2234) fue empleada en todos los experimentos y está depositada en la colección de cultivos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (BAFC). Los cultivos madre se mantuvieron en 2% de agar extracto de malta (MEA) a 4°C.

2.2 *Selección del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas*

A fin de evaluar el mejor medio de cultivo para el escalado y purificación de las enzimas lignolíticas, *T. versicolor* fue cultivado en Erlenmeyers de 500 ml en condiciones de agitación en cuatro medios distintos. Se emplearon dos medios sintéticos: GA (Levin y Forchiassin, 1991) y Kirk (Tien y Kirk, 1988) y dos medios complejos consistentes uno de ellos en harina de soja y agua destilada (en concentración 30 g.l⁻¹), y el otro en jugo de tomate ecológico (Albi & Co, Alemania) y agua destilada (50:50 v/v). Los cultivos fueron incubados durante 18 días a 25°C y las muestras fueron tomadas a intervalos regulares de 2 a 3 días en forma estéril. En cada muestra se determinaron las actividades enzimáticas lignolíticas.

2.3 *Escalado y producción de enzimas lignolíticas*

Como primer paso en el proceso de escalado y evaluación de las condiciones de cultivo de la cepa, se cultivó al hongo en biorreactores de 5 litros (Biostat 8 plus; Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania) (Fig. 2). Para ello se prepararon 3 litros de los medios de cultivo soja y jugo de tomate, y se inocularon cada uno con 200 ml del hongo pre-cultivado en Erlenmeyers durante 7 días en el mismo medio. La fermentación se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes: 130 rpm, Velocidad de aireación 4 l min⁻¹ y

24°C, el pH no fue regulado. A intervalos regulares de 2 o 3 días se tomaron muestras y se evaluaron las actividades de enzimas lignolíticas.

El siguiente paso consistió en la producción de dichas enzimas lignolíticas en un biorreactor de 30 litros (Biostat B; Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania). Veinte litros del medio líquido complejo jugo de tomate se utilizaron como medio de crecimiento. El inóculo consistió en 1 litro de una suspensión fúngica homogeneizada y pre-cultivada en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 200 ml del mismo medio en condiciones de agitación a 100 rpm y 24°C durante 10 días. Para garantizar la producción de lacasa y MnP por el hongo, se añadieron $MnCl_2$ y $CuSO_4$ 60 horas después de la inoculación (concentración final 500 μM y 250 μM , respectivamente). Las muestras (1 ml) se tomaron cada dos o tres días, y se midieron las actividades enzimáticas lignolíticas y el pH. La fermentación se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes: 120 rpm, Velocidad de aireación 4 l min^{-1} y 28°C, el pH no fue regulado. El cultivo completo fue cosechado por filtración luego de 7 días y se utilizó para su posterior purificación y estudios del secretoma.

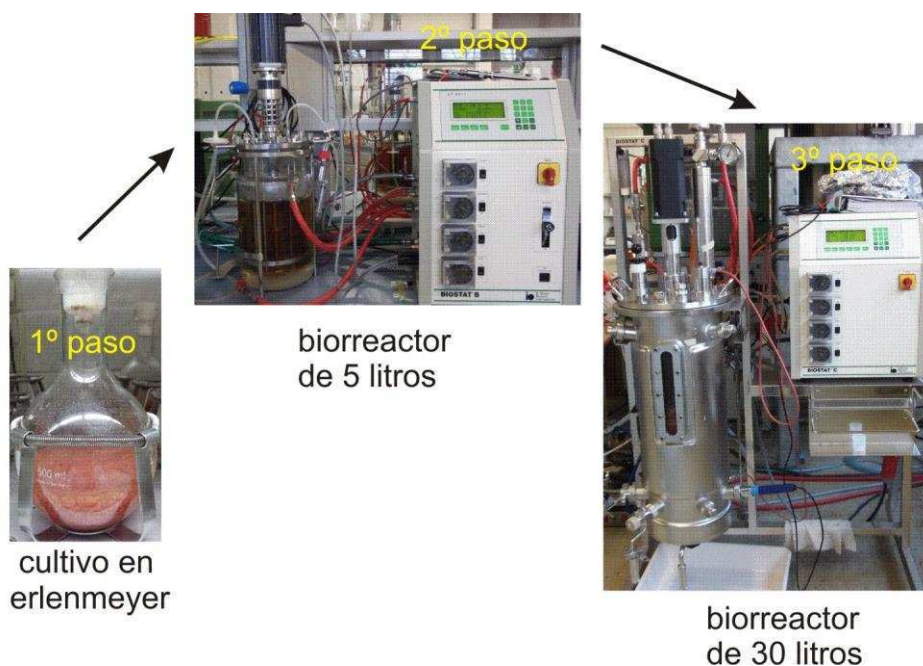


Fig. 2: Esquema resumido de los pasos de escalado llevados a cabo para el cultivo de *T. versicolor* en medio Jugo de tomate

2.4 Purificación de enzimas

La biomasa fúngica se separó por filtración (filtro de GF6; Whatman, Dassel, Alemania) y el líquido de cultivo obtenido se concentró y se dializó mediante ultrafiltración a 11°C (filtro cassette 10 kDa; Pall-Filtron, Dreieich, Alemania). Una pequeña parte de este concentrado se analizó utilizando métodos proteómicos (ver más abajo). Para la obtención de las enzimas (lacasa y peroxidasas), la mayor parte del extracto bruto se purificó en diferentes pasos de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando aniones de cambio como medio de separación. En el primer paso, las proteínas extracelulares se separaron en columna Q-Sepharose® (columna de intercambio aniónico fuerte: 16 mm x 100 mm, GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y se eluyeron con un gradiente lineal de 0-0.8 M de NaCl en buffer acetato de sodio 10 mM (pH 5.5) a una tasa de flujo de 5 ml min⁻¹. Las fracciones con actividades lacasa/peroxidasa se combinaron, concentraron, dializaron frente a acetato de sodio 10 mM (pH 5.5-7.0) con concentradores Vivaspín de 10 kDa (Sartorius Stedim Biotech; Göttingen, Alemania) y fueron cargadas en una columna Mono-Q® (10 mm × 100 mm, GE Healthcare, Freiburg, Alemania). Las proteínas adheridas se eluyeron con buffer acetato de sodio 10 mM conteniendo además NaCl 2 M a una velocidad de flujo de 6 ml min⁻¹ (este segundo paso fue suficiente para la separación de lacasa). Las fracciones con actividad peroxidasa se purificaron adicionalmente mediante columna Mono-S (10 mm x 100 mm, GE Healthcare, Freiburg, Alemania) que se eluyó con 10 mM de buffer acetato sódico conteniendo NaCl 2 M a pH 4.5. Finalizada la última etapa de purificación, las fracciones finales de cada una de las enzimas lacasa, MnP y VP se combinaron, concentraron y almacenaron a -20°C. La elución de proteínas fue monitoreada a 280 nm (proteína total) y 407 nm (hemo). Parte de la fracción VP obtenida se purificó adicionalmente por HPLC-SEC semi-preparativa con equipo HPLC (Agilent serie 1200, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna Biosep-SEC-S-2000 (300 x 7.8 mm, Phenomenex) bajo condiciones isocráticas (flujo, 1 ml min⁻¹ a 25°C; disolvente: mezcla acuosa de acetato de sodio 50 mM y cloruro sódico 100 mM, pH 6.5). Se realizó un SDS-PAGE para verificar la pureza de las enzimas purificadas (12% NuPAGE Bis-Tris gel; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). El análisis de isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo utilizando geles de IEF prefabricados (pH 3-10; Invitrogen). Después de la separación electroforética, el gel se tiñó y las bandas de proteínas se visualizaron con el kit de tinción con azul coloidal (Invitrogen). Las bandas individuales de proteínas de interés fueron cortadas de gel y se analizaron adicionalmente por nano LC-MS/MS (ver más abajo).

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el kit de ensayo de proteínas Roti [®]-Nanoquant (Roth, Karlsruhe, Alemania) con albúmina de suero bovino como estándar.

2.5 Secretoma y análisis de péptidos por nano LC-MS/MS

El secretoma de *T. versicolor*, así como las enzimas purificadas individuales (extraídas del gel) fueron investigados por LC-MS/MS. En total, se diluyeron 4 g de lisados de proteínas con bicarbonato de amonio 20 mM (ABC) a una concentración final de 1 M de urea. Las muestras fueron reducidas (DTT 2.5 mM durante 1 h a 60°C) y alquiladas (iodacetamida 10 mM durante 30 min a 37°C). La proteólisis se realizó utilizando tripsina (Promega, Madison, WI) con una relación de 1:25 a 37°C. La digestión trípica se detuvo mediante la adición de ácido acético a una concentración final de 1%, seguido de desalación y purificación. Los péptidos fueron separados proteolíticamente (400 ng) antes de los análisis de espectrometría de masas por HPLC en fase reversa en una columna Acclaim PepMap100-columna 15 cm (C18 3 m, 100 Å) utilizando un sistema EASY-nLCProxeon (Thermo Scientific, Waltham, MA) a una velocidad de flujo constante de 300 nL min⁻¹. La separación se realizó usando un gradiente no lineal de 70 min con ácido acético 0.1%, acetonitrilo al 2% en agua (disolvente A) y ácido acético 0.1% en acetonitrilo al 100% (disolvente B). Los péptidos separados fueron monitoreados usando un espectrómetro de masas Orbitrap LTQ (Thermo Scientific). El instrumento de masa fue operado en el modo independiente de adquisición de datos (DDA). Los datos crudos del análisis de MS fueron procesados mediante Discoverer proteoma (Thermo Scientific, v1.3.0.339). A partir de los datos de MS-espectrales se realizaron búsquedas en relación a i) las secuencias genómicas de *T. versicolor* v1.0 (14.296 secuencias) obtenidas de la base de datos JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) (Floudas et al., 2012), y ii) fenoloxidasas y peroxidasas fúngicas (43 secuencias) utilizando el algoritmo SEQUEST. Se consideraron como identificados, con un elevado grado de confiabilidad, aquellos péptidos con un grado de correlación o score >2 (SEQUEST) y que poseyeran ≥ 2 péptidos. Las enzimas identificadas se seleccionaron y agruparon sobre la base de los números de Comisión de Enzimas (número EC), que identifica la enzima en términos de la reacción o reacciones catalíticas. La abundancia relativa de las proteínas

seleccionadas se calculó basándose en el factor de abundancia espectral normalizada (NSAF). El NSAF para una proteína k es el número de recuentos espectrales (SPC) que identifican a una proteína, k, dividido por la longitud de la proteína (L), dividido por la suma de $SPC \cdot L^{-1}$ para todas las proteínas N en el experimento (Zybailov et al., 2006). La filogenia de las peroxidasas clase II (Morgenstern et al., 2008) se calculó utilizando los algoritmos incluidos en 6.0 Geneious (Biomatters Ltd, Auckland, Nueva Zelanda).

2.6 Métodos enzimáticos

La actividad lacasa se determinó siguiendo la oxidación de ABTS usando 50 μ l de enzima en 50 mM de buffer citrato-fosfato (pH 4.5, 25°C) a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bourbonnais et al., 1995). La actividad MnP se midió a 270 nm ($\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) siguiendo la formación de complejos Mn^{3+} en buffer malonato de sodio 50 mM (pH 4.5) conteniendo MnCl_2 0.5 mM, H_2O_2 0.2 mM y 50 μ l de muestra enzimática. La reacción se inició a 25°C al adicionar H_2O_2 (Wariishi et al., 1992). La actividad lignin peroxidasa (LiP) se midió con veratril alcohol (Kirk et al., 1986) siguiendo la formación de veratrilaldehído a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en buffer tartrato de sodio 50 mM (pH 3.0) conteniendo 5 mM veratril alcohol, 0.2 mM H_2O_2 , y 100 μ l de crudo enzimático; la reacción se inició con H_2O_2 . La actividad versatil peroxidasa (VP) se midió a 598 nm ($\epsilon_{598} = 47600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) monitoreando la conversión del colorante azoico Reactive Black 5 en buffer tartrato de sodio 50 mM (pH 3.0) conteniendo 0.1 mM Reactive Black 5 y 0.2 mM H_2O_2 (Heinfling et al., 1998). Una unidad enzimática (UE) se define como la cantidad de enzima que se requiere para oxidar un μ mol de sustrato por minuto o en el caso de la VP para clivar 1 μ mol del colorante por minuto, la actividad enzimática se expresa en UE por litro de medio líquido.

2.7 Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como valores medios con la desviación estándar (SD); los análisis de varianza se llevaron a cabo utilizando el programa ANOVA seguido por el test de Tukey utilizando el programa Statistica 7.0. Se consideraron significativas las diferencias en $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Selección del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas

T. versicolor fue cultivado en cuatro medios de cultivo distintos a fin de evaluar la producción enzimática en los mismos. Las mayores actividades de las enzimas lacasa (1771.44 U.l^{-1}) y VP (29.64 U.l^{-1}) fueron producidas en el medio jugo de tomate, mientras que las mayores actividades de las enzimas MnP (296.00 U.l^{-1}) y LiP (39.61 U.l^{-1}) fueron producidas por *T. versicolor* en el medio soja. En los medios Kirk y GA los títulos de las actividades lignolíticas lacasa y VP fueron menores que en los otros dos medios, siendo nulos para las actividades MnP y LiP (Fig. 3).

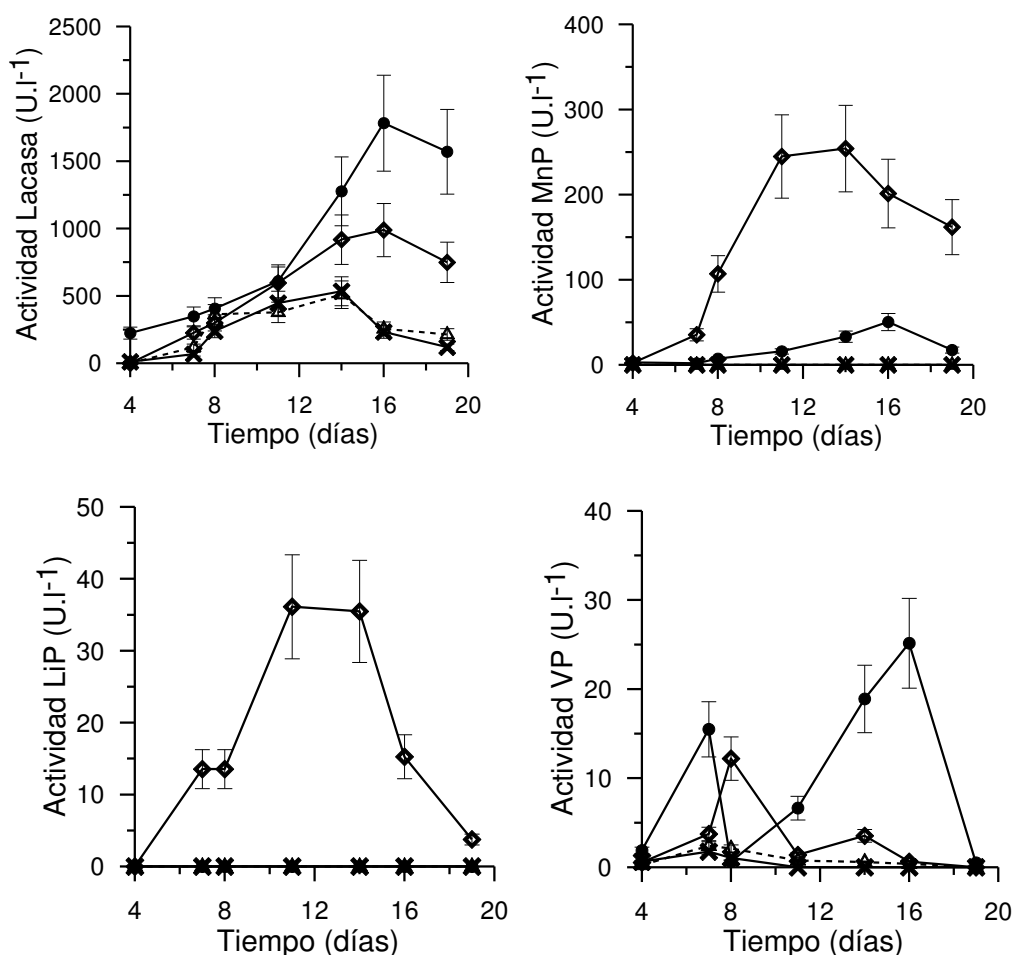


Fig. 3: Actividades lignolíticas lacasa, manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y versátil peroxidasa (VP) producidas por *T. versicolor* en los medios tomate (círculos) soja (rombos) Kirk (cruces) y GA (línea punteada).

3.2 Producción y purificación de enzimas

A fin de evaluar la capacidad de la cepa de crecer y producir enzimas a mayor escala, se cultivó a *T. versicolor* en un biorreactor de cinco litros durante 15 días. Los títulos finales de enzimas Lacasa y MnP producidas por esta cepa en los medios jugos de tomate y soja se observan a continuación:

Medio de cultivo	Lacasa (U.l ⁻¹)	MnP (U.l ⁻¹)
Soja	1790	236
Jugo de tomate	2533	72

No se detectaron actividades lignolíticas LiP o VP durante el periodo de cultivo. Dado los elevados títulos de enzima lacasa producidos en el medio jugo de tomate y la mayor velocidad de colonización en este medio con respecto al medio soja, se escogió el primero para cultivar a *T. versicolor* a una mayor escala. De esta forma, y con el objetivo de obtener una cantidad suficiente de enzimas lignolíticas para su posterior purificación, *T. versicolor* se cultivó en un biorreactor de 30 litros por el periodo de 7 días. En la Fig. 4 se muestra la evolución temporal de la producción de lacasa, VP y MnP durante la fermentación en 30 litros de *T. versicolor* en un medio de jugo de tomate.

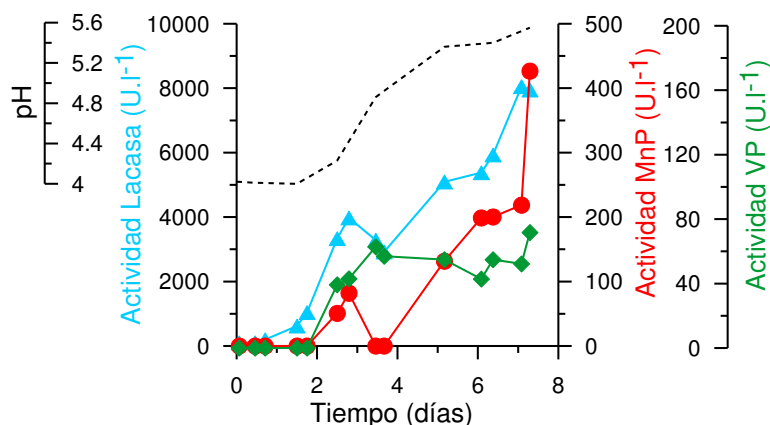


Fig. 4: Producción de lacasa (triángulos), VP (rombos) y MnP (círculos) por *T. versicolor* en medio jugo de tomate durante la fermentación en biorreactor de 30 litros. La línea de puntos muestra la variación de pH.

Visualmente, el hongo creció relativamente rápido en este medio formando gran cantidad de biomasa. Dado que este tipo de medio es una suspensión que contiene pequeñas partículas sólidas, la determinación gravimétrica de la biomasa no fue posible. La suplementación con Mn^{2+} y Cu^{2+} evidentemente garantizó la producción de las oxidoreductasas lignolíticas; las actividades enzimáticas alcanzaron su primer pico en el día 3 de cultivo, luego, se observó un hombro/meseta alrededor del día 5 y 6, y un nuevo aumento hasta la cosecha en el día 7 alcanzando las siguientes actividades finales en el medio de cultivo líquido: lacasa $-7947 U l^{-1}$, MnP $-427 U l^{-1}$ y VP $-72 U l^{-1}$. El aumento de las actividades enzimáticas fue acompañado por un aumento en el pH de 4 a 5.5 comprendido entre los días 2 y 4.

La biomasa fúngica se eliminó por filtración y el líquido de cultivo obtenido, libre de células, se concentró y se dializó mediante ultrafiltración. Luego de este último paso, el cultivo fue concentrado 10 veces y posteriormente fue fraccionado por cromatografía de intercambio aniónico (Q-sefarsa). El perfil de elución de FPLC del primer paso de purificación realizado en Q-sefarsa se muestra en la Fig. 5.

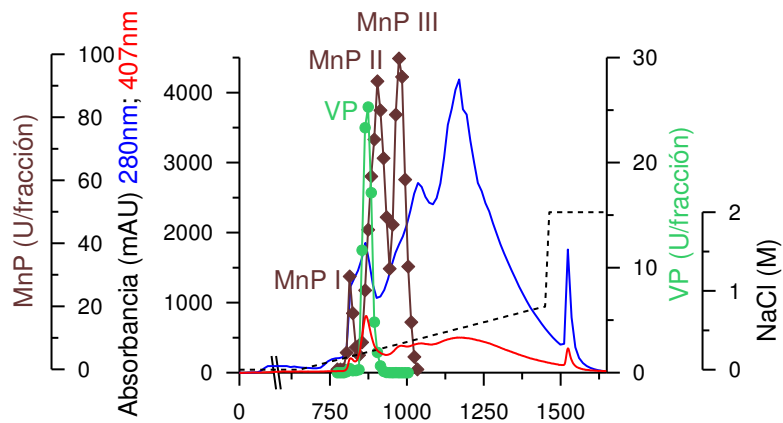


Fig. 5: Perfil de elución de FPLC del primer paso de purificación en columna Q sefarosa a pH 5.5: absorbancia a 407 nm (línea roja) y a 280 nm (línea azul), actividad MnP (rombos marrones), actividad VP (círculos verdes) y gradiente de NaCl (línea de puntos).

La mayor parte de la actividad de lacasa (30 kU) no se retuvo bajo las condiciones utilizadas, lo que indica un punto isoeléctrico por encima de pH 5.5. El perfil de elución mostró cuatro picos de diferente actividad, tres con capacidad de oxidar Mn^{2+} y una con capacidad de oxidar alcohol veratrílico. La fracción conteniendo la lacasa (la no retenida) se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q a pH 7.0 alcanzando una actividad específica final de $712 U mg^{-1}$ (Tabla 1). La masa molecular se estimó por SDS-PAGE resultando en 63 kDa (Fig. 6).

Tabla 1: Purificación de las oxidoreductasas secretadas por *T. versicolor* en el medio jugo de tomate.

Paso de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Purificación (pasos)
Lacasa					
Ultrafiltración	47966	846.5	57.1	100.0	
Q-Sefarosa	39523	64.0	615.3	82.1	11.0
Mono Q	19935	28.0	712.0	42.2	13.1
MnP I					
Ultrafiltración	3817	846.5	4.5	100.0	
Q-Sefarosa	510	56.0	9.1	13.4	2.0
Mono Q	427	19.0	22.5	11.2	5.0
Mono S	220	6.0	36.7	5.8	8.1
MnP II					
Ultrafiltración	3817	846.5	4.5	100.0	
Q-Sefarosa	1619	115.0	14.1	42.4	3.1
Mono Q	1536	13.0	118.2	40.2	26.2
Mono S	245	2.0	122.5	6.4	27.2
MnP III					
Ultrafiltración	3817	846.5	4.5	100.0	
Q-Sefarosa	2465	80.0	30.8	64.6	6.8
Mono Q	1172	27.0	43.4	30.7	9.6
Mono S	822	4.0	205.5	21.5	45.6
VP					
Ultrafiltración	540	846.5	0.6	100.0	
Q-Sefarosa	411	75.3	5.5	76.1	9.1
Mono Q	130	12.3	10.6	24.1	17.7
Mono S	37	7.7	4.8	6.9	8.0
HPLC-SEC	22	6.2	3.6	4.1	6.0

Las actividades MnPs (MnP I, MnP II y MnP III) también se sometieron a purificación adicional, en primera instancia por columna Mono Q (Tabla 1) y luego por columna Mono S. Finalmente, las fracciones purificadas MnP formaron bandas individuales en el

SDS-PAGE con excepción de MnP I (Fig. 6). Estas enzimas fueron purificadas 8-, 27- y 45- veces con rendimientos globales del 5.8%, 6.4% y 21.5%, respectivamente.

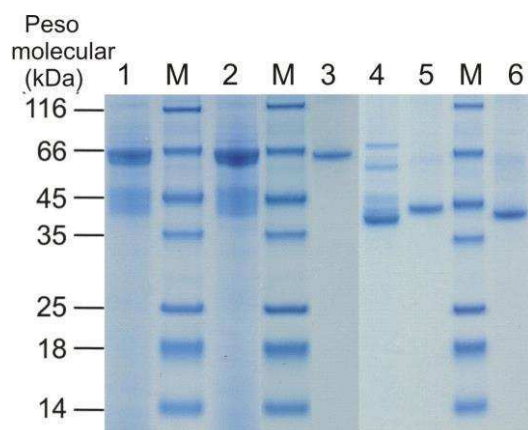


Fig. 6: SDS-PAGE ilustrando los diferentes pasos de purificación de las oxidoreductasas producidas por *T. versicolor*: línea 1, cultivo líquido; 2, ultra-filtrado (10 kDa); 3, Lacasa; 4, MnP I; 5, MnP II; 6, MnP III, M, marcadores de proteínas.

En la Tabla 1 se observa un resumen de las diferentes etapas de purificación. Las masas moleculares de las MnPs (Fig. 6) se encontraron en el rango de 40 a 44 kDa. Como se mencionó antes, la enzima MnPI no pudo ser purificada hasta un grado de homogeneidad elevado, como puede observarse en las cuatro bandas débiles adicionales en el SDS-PAGE.

Después de someter el extracto crudo jugo de tomate a dos pasos de cromatografía de intercambio de aniones, la actividad específica de la VP aumentó casi 20 veces, hasta 10.6 U mg^{-1} (Tabla 1). La separación por Mono Q, sin embargo, no fue satisfactoria, como queda indicado por varias bandas en el gel de SDS (datos no mostrados). Por lo tanto se llevaron a cabo dos etapas de purificación adicionales (Fig. 7) utilizando columnas Mono S y HPLC-SEC. La combinación de estas etapas cromatográficas no condujo a mayores actividades específicas (Tabla 1), pero resultó en bandas individuales en los análisis electroforéticos (inserciones de la Fig. 7). La masa molecular de la VP purificada fue 44.6 kDa determinada por HPLC-SEC; y 45.5 kDa según SDS-PAGE reductora, y el punto isoeléctrico 4.0.

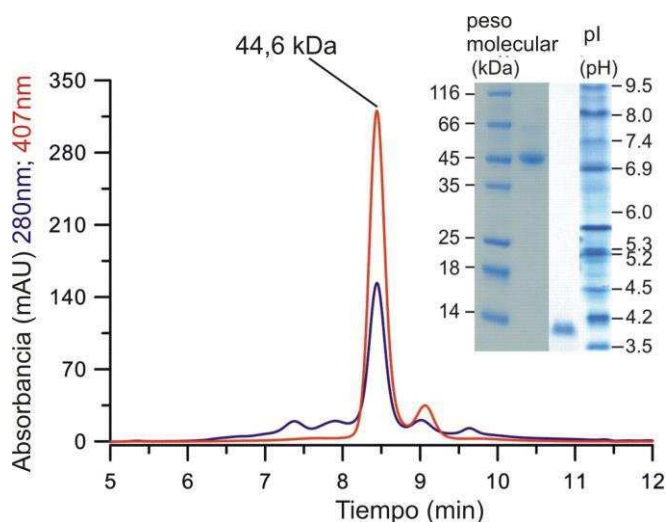


Fig. 7: Perfil de elución de HPLC-SEC de la VP de *T. versicolor* pre-purificada: absorbancia a 407 nm (línea roja) y a 280 nm (línea azul). Los insertos muestran los geles SDS-PAGE (izquierda) y de isoelectroenfoque (derecha) de la VP purificada.

3.3 *Análisis del secretoma*

A partir del análisis del secretoma de *T. versicolor* creciendo en medio jugo de tomate se identificaron 190 péptidos redundantes. De ellos se seleccionaron las proteínas con $\text{score} > 2$ y más de dos péptidos. Ellas resultaron en la selección de 121 proteínas en el medio ultrafiltrado. Se calculó la abundancia relativa de las proteínas seleccionadas; la enzima lacasa fue la proteína más abundante secretada ID 68023 (11.01%), mientras que MnP ID 74595 se ubicó en el segundo lugar (4.38%). Esta MnP junto con MnP ID 51.375 (3.49%), MnP ID 44.897 (4.49%) y MnP ID 131350 (0.49%) fueron el segundo grupo de enzimas modificadoras de lignina más abundante secretada por esta cepa (Fig. 8).

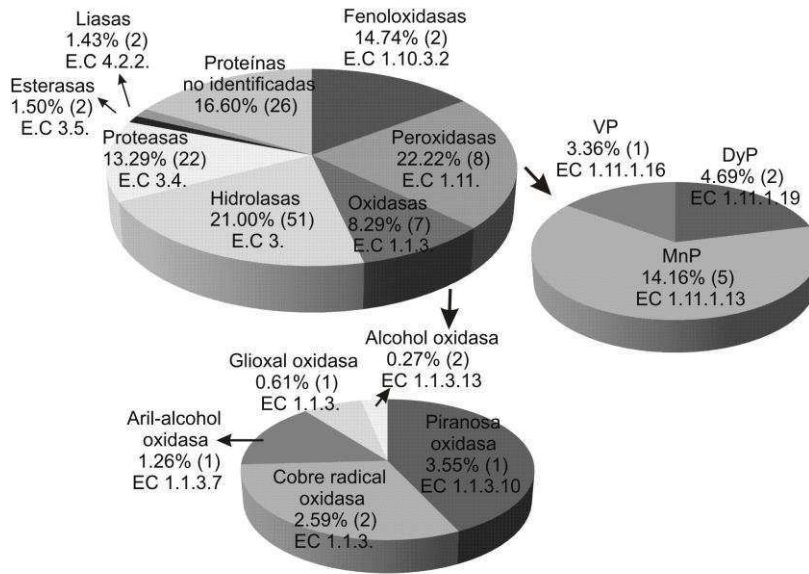


Figura 8: Un total de 121 proteínas secretadas fueron identificadas y agrupadas en 8 categorías de acuerdo al número EC. La abundancia relativa se calculó en base al factor espectral de abundancia normalizado (NSAF, los valores están dados en porcentaje). El número de enzimas que corresponde a cada categoría se muestra entre paréntesis.

En la Fig. 9, se presentan las relaciones filogenéticas de las peroxidasas clase II de *T. versicolor*. - MnPs, VPs y las LiPs forman un clado en el árbol filogenético de las peroxidasas de clase II. Cinco de las proteínas secretadas se colocaron en el clado MnP y uno en el pequeño clado VP. Entre las peroxidasas de clase II extracelulares (MnPs, LiPs y VPs), sólo la LiP no fue expresada por esta cepa en las condiciones de cultivo en medio jugo de tomate.

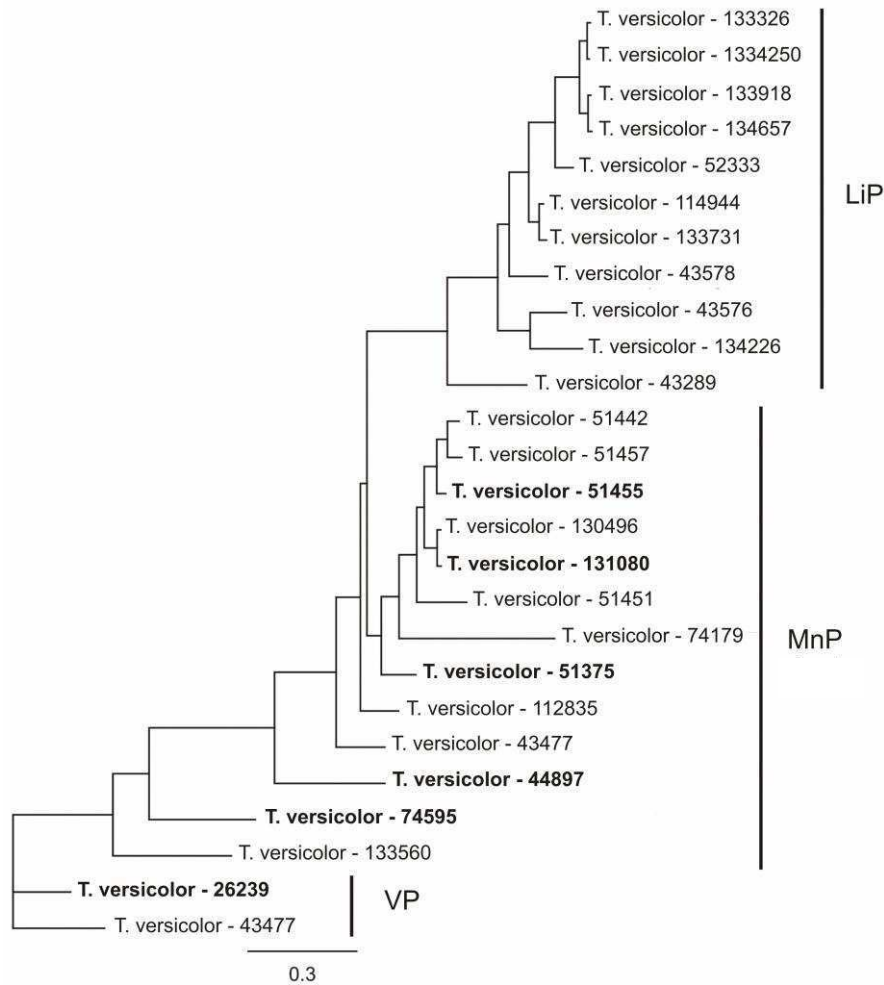


Fig. 9: Relaciones filogenéticas entre las peroxidasas Clase II de *T. versicolor*. En negrita se señalan las proteínas expresadas por el hongo durante el crecimiento en el medio jugo de tomate.

La Fig. 10 muestra la alineamiento de proteínas de las peroxidasas clase II expresadas por *T. versicolor*. Todas las características de los ligandos de aminoácidos que definen el sitio de unión a Mn^{2+} (D: residuos de aspartato y E: residuo de glutamato) de MnPs y VP estuvieron presentes. La VP expresada (ID 26239) mostró también el residuo característica triptófano (W) que es crucial para la oxidación de sustratos de alto potencial redox y para las vías LRET (transferencia de electrones de largo alcance) (Fig. 10), por otro lado, encontramos residuos necesarios para las vías LRET I, II y III presentes en las secuencias de genes de *T. versicolor* (Morgenstern et al., 2008). De las cinco diferentes MnPs producidas por *T. versicolor* en medio jugo de tomaste, tres - llamadas MnP I (score: 32.42), MnP II (score: 111.88) y MnP III (score: 191.51) - fueron correlacionados con MnP I ID: 131080 MnP II ID: 44897 y MnP III ID: 74595

en el genoma de *T. versicolor*. Por otra parte, la VP purificada fue identificada como VP ID 26239.

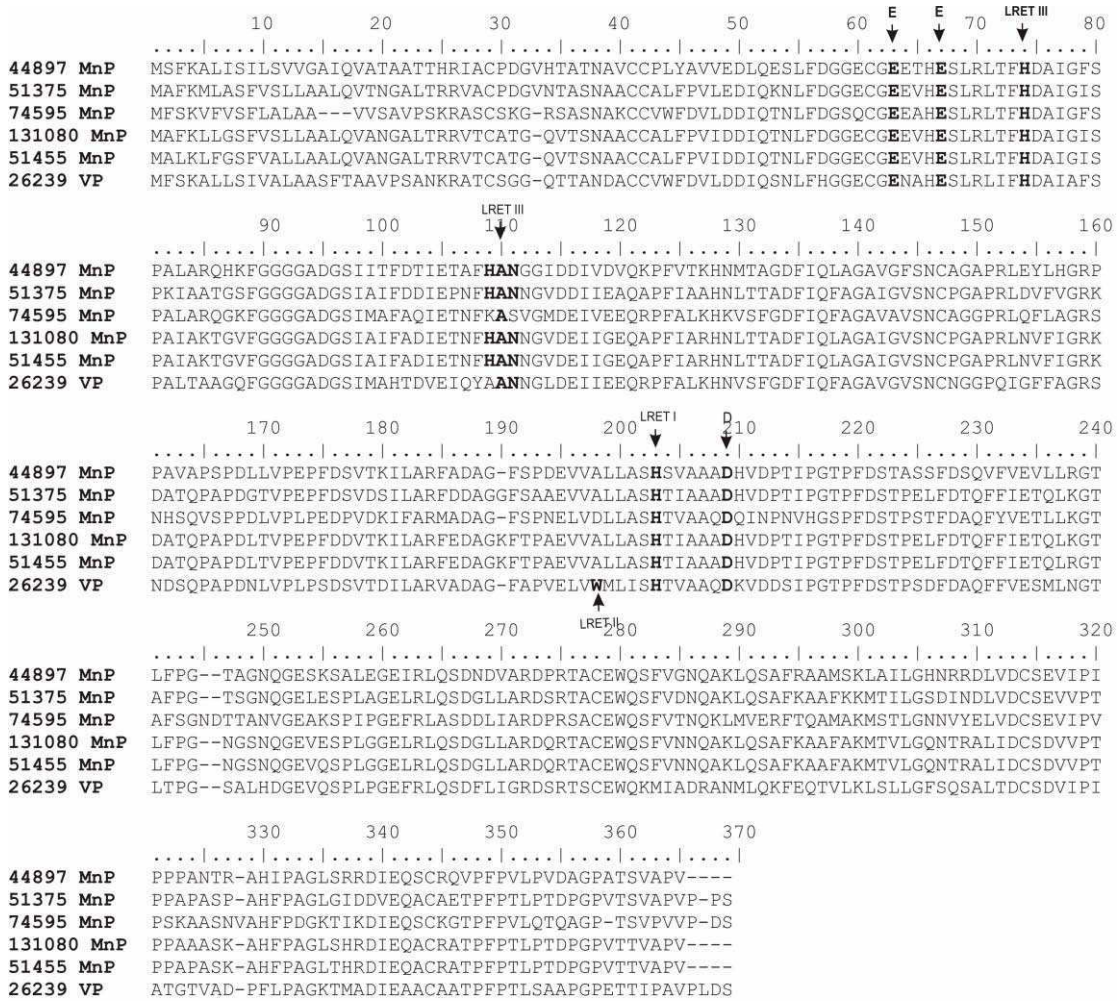


Fig. 10: Alineamiento de proteínas de las secuencias correspondientes a las peroxididas clase II de *T. versicolor* expresadas en el medio jugo de tomate. Las flechas señalan los residuos de unión característicos de la MnP, el ácido glutámico (E) y aspartato (D); y los residuos propuestos por estar activos en la vía de los LRET I, II y III, así como el residuo característico presente en la VP, el triptófano (W).

4 Discusión

T. versicolor BAF 2234 fue seleccionado entre 25 cepas de basidiomycetes argentinas por su tolerancia a los compuestos fenólicos (Carabajal et al., 2012). Para tener una visión de la fisiología de la cepa fúngica, se exploró su secretoma y se purificaron las enzimas oxidativas clave. Este hongo es un miembro importante del grupo

ecofisiológico de hongos de podredumbre blanca con reconocido potencial de biodegradación y biorremediación (Marco-Urrea et al., 2009). El hongo fue cultivado en un medio complejo de jugo de tomate y el enfoque proteómico fue seguido para analizar las enzimas secretadas. Se identificó un número considerable de las proteínas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica, entre estas, enzimas hidrolasas, peroxidasas y oxidasas fueron las enzimas más abundantes.

La producción de las oxidoreductasas puede ser estimulada por la presencia de metales pesados, fenoles o por medios de cultivo que contienen naturalmente elevadas cantidades de metabolitos vegetales de bajo peso molecular (Hatakka, 2001; Liers et al., 2007; Ullrich et al., 2004). Los medios del tipo jugo de tomate son medios de cultivo no contaminantes ricos en compuestos fenólicos como los flavonoides, taninos y tocoferoles (Hertog et al., 1992), así como en hidrocarburos no saturados, como los carotenoides y fitoenos (Khachik et al., 1995). Ellos han sido usados como medios de cultivo desde 1920, primero para cultivar lactobacilos acidófilos, y más tarde también para otros eucariotas como las levaduras (Kulp, 1927). Siete años más tarde, diferentes grupos de trabajo mostraron que el jugo de tomate diluido sólo, o en combinación con sólidos naturales, puede estimular la producción de las oxidoreductasas extracelulares; tales como MnP y lacasa en los agárlicos (Rohene-Soustrade et al., 1992; Ullrich et al., 2004). Teniendo en cuenta estos hechos, *T. versicolor* fue cultivado en un biorreactor de 30 litros en medio de cultivo jugo de tomate suplementado con cobre (Cu^{2+}) y manganeso (Mn^{2+}) con el fin de obtener grandes cantidades de enzimas modificadoras de lignina para la posterior purificación y estudio de su secretoma. Se purificaron exitosamente una polifenol oxidasa (lacasa), y cuatro peroxidasas de clase II, MnP (3) y VP (1). De los dos lacasas secretadas por *T. versicolor*, la lacasa (ID 68293) fue tres veces más abundante que la otra lacasa a nivel del secretoma. El pI calculado de esta isoenzima es 6.44, el cual se ajusta muy bien con la fracción principal de lacasa obtenida en la primera fase de intercambio aniónico a pH 5.5, la cual eluyó primero, sin unirse a la columna, pero que luego fue separada en el segundo paso de purificación a pH 7.0. La segunda lacasa tiene un pI calculado de 5.08. Se observaron pIs y masas moleculares similares en lacasas de otro miembro del género *Trametes*, las tres lacasas purificadas de *T. villosa* mostraron masas moleculares de 60 a 70 kDa determinadas por SDS-PAGE y diferentes pIs (3.5, 5-6 y 6-6.5 correspondiente a lacasas 1, 2 y 3, respectivamente secretadas por esta cepa) (Yaver et al., 1996). La masa molecular calculada de la lacasa (ID 68293) representa con 55.8 kDa aproximadamente el 89% del

peso molecular determinado de la lacasa purificada (63 kDa), la diferencia observada puede referirse a la cantidad típica de glicosilación del 11% (Baldrian, 2006).

En los basidiomycetes que degradan lignocelulosa, las MnPs son hasta el momento, las peroxidases clase II más frecuentes (Hofrichter, 2002; Wesenberg et al., 2003). *T. versicolor* secretó cinco MnPs en el medio jugo de tomate, siendo la MnP III la enzima con el mayor rendimiento y grado de pureza. Las masas moleculares de las MnPs purificadas se encuentran en el rango de las típicas MnPs correspondientes a 40 a 45 kDa (Lundell et al., 2010), incluyendo una MnP de 43-kDa recientemente purificada a partir de otra cepa de *T. versicolor* (Asgher y Iqbal, 2011). Hofrichter (2002) menciona cinco miembros del género *Trametes* productores de MnPs en el rango de masas comprendidas en 38-45 kDa, así como una MnP de *T. versicolor* con una masa de 49 kDa. Las masas moleculares calculadas en este trabajo difieren ligeramente de los valores detectados, indicando un grado relativamente bajo de glicosilación (<5%). En contraste, en la VP purificada, se observó un mayor grado de glicosilación de alrededor de 16%, el que fue calculado en base a los datos obtenidos en el análisis proteómico y fue estimado en 38.1 kDa. Además, el pI determinado difiere del teórico, probablemente también debido a la glicosilación postraducciona (Gianazza, 1995). *T. versicolor* es capaz de producir diferentes enzimas modificadoras de la lignina, pero cada una contribuye de diferente manera a la degradación final de la lignina. Entre estas enzimas se encuentran diferentes MnPs, LiPs, lacasas y oxidasas generadoras de peróxido (Hatakka, 1994). Lacasa y MnP fueron las principales enzimas modificadoras de la lignina detectadas en los cultivos en jugo de tomate de *T. versicolor* BAFC 2234, así como en un estudio previo con la misma cepa en cultivos suplementados con fenol (Carabajal et al., 2012). La LiP no fue detectada en ninguno de los dos estudios, aunque su purificación a partir de cultivos de *T. versicolor* limitantes en C y N fue reportada con anterioridad (Johansson y Nyman, 1993). La LiP no es una enzima fácil de detectar, ya que su actividad puede verse enmascarada o reprimida en medios de cultivo complejos, tal como fue informado por Paice et al. (1993), durante el blanqueo de pulpa de papel con *T. versicolor*. Por otra parte, la represión de la expresión de LiP por Mn^{2+} - el cual fue utilizado en el presente estudio como inductor- fue observada en *P. chrysosporium* (Pérez y Jeffries, 1992). Por otro lado, peroxidases decolorantes de tintes (Dye decolorizing peroxidases, DyPs) -un grupo recientemente descubierto de hemo-peroxidases (EC 1.11.1.19), que representa una superfamilia de peroxidases de clase II que evolucionó independientemente (Hofrichter et al, 2010.)- también fueron secretadas

por *T. versicolor* 2234. DyPs decoloran colorantes sintéticos (Sugano, 2009), catalizan reacciones notables, tales como la escisión de derivados de antraquinona, y pueden ser parte de un sistema de biocatálisis "alternativo" para la oxidación directa de compuestos aromáticos recalcitrantes metoxilados como la lignina (Liers et al., 2010). Sin embargo, el mecanismo catalítico de oxidación de la lignina catalizada por la DyP, que a diferencia de VP no oxida Mn^{2+} , sigue sin dilucidar. Hasta ahora, DyPs han sido encontradas en varias especies bacterianas y fúngicas, tales como *P. ostreatus*, *Termitomyces albuminosus*, *Marasmius scorodoni*, *Auricularia auricula-judae*, *I. lacteus* y *Thanatephorus cucumeris*, pero no en *T. versicolor* (Shimokawa et al., 2009; Sugano, 2009; Liers et al., 2010; Salvachua et al., 2013). *T. versicolor* secretó también enzimas auxiliares degradadoras de lignina, tales como glioxal oxidasa, glucosa oxidasa y aril-alcohol oxidasa, que desempeñan un papel importante en la producción de H_2O_2 como co-sustrato de peroxidasas y están involucradas en los circuitos de retroalimentación relacionados la degradación de lignina cercana a la celulosa y la hemicelulosa en la naturaleza (Leonowicz et al., 1999; Cullen y Kersten, 2004). Los resultados de este estudio pueden ayudar a ampliar el conocimiento sobre las herramientas enzimáticas del hongo *T. versicolor* y, en general en este diverso género de hongos. Recientemente, varios secretomas se han descrito para diferentes especies del género *Trametes*. El secretoma de *T. trogii*, creciendo en un medio mínimo con glucosa y tartrato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, fue analizado por Ji et al. (2012). Se encontró que el hongo secreta varias enzimas que se cree participan en la degradación de la lignina (Hatakka, 2001), entre ellas la LiP, MnP, lacasas, aril-alcohol oxidasa, piranosa-oxidasa 2, y celobiosa deshidrogenasa. *Trametes gibbosa* creciendo en salvado de maíz secretó celulasas, xilanasas y enzimas que degradan la pectina, pero sólo lacasa como representante de las enzimas modificadoras de la lignina (Berrin et al., 2012). Por otro lado, MnP, VP y LiP, así como genes de lacasa se encontraron en el genoma de otra cepa de *T. versicolor* creciendo en madera de álamo, pero ninguna de estas enzimas LiP o VP fueron detectables en los cultivos filtrados y analizados por LC-MS/MS (Floudas et al., 2012). En este trabajo una VP de *T. versicolor* fue purificada por primera vez. El ciclo catalítico de la extensamente estudiada VP de *P. eryngii*, es una combinación de las actividades de la LiP y MnP-específica; el residuo de triptófano característico de la LiP se encuentra en VP (Trp164) junto con tres residuos de aminoácidos ácidos característicos de MnP (Asp179, Glu35 y Glu39) involucrados en la unión a Mn^{2+}

(Martínez, 2002; Ruiz-Dueñas et al., 2009) y en la posterior oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , un paso clave en las fases iniciales de la biodegradación de la lignina (Martínez et al., 2005; Lundell et al., 2010). Los últimos residuos son conservados como en todas las peroxidasas de clase II con actividad oxidante-Mn (Kusters-van Someren et al., 1995). Todos estos residuos también se encontraron en las secuencias de las peroxidasas MnP y VP secretadas por *T. versicolor* 2234.

5 Conclusiones

Para la evaluación del potencial de degradación de un hongo y su sistema de modificación de lignina, la caracterización de su secretoma ha demostrado ser una herramienta útil. En este capítulo de la tesis se ofrece un catálogo de las proteínas enzimáticas más relevantes secretadas por *T. versicolor* BAFC 2234 durante el crecimiento en un medio complejo (jugo de tomate). Mediante el análisis proteómico, contribuiremos a identificar más fácilmente las enzimas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica, es decir, peroxidasas, oxidasas e hidrolasas. El enfoque proteómico ha sido combinado con la producción y purificación de proteínas (lacasa, MnP y VP), las que además, verifican los datos del secretoma. La diversidad observada de las enzimas lignocelulosicas secretadas en un producto natural tal como el jugo de tomate puede fomentar más investigaciones sobre los procesos de degradación por hongos en medios complejos a base de plantas, que representan microcosmos simples, pero eficaces.

CAPITULO 4

***Remoción de compuestos fenólicos por el hongo libre e
inmovilizado***

1 Antecedentes

Al momento de emplear microorganismos libres en los sistemas de tratamiento de efluentes contaminados, dos son las limitaciones principales que se presentan, por un lado la toxicidad propia de los contaminantes y por otro la competencia entre las poblaciones nativas y las introducidas (Fantroussi y Agathos, 2005). Una forma de salvar estos problemas es a través del uso de microorganismos inmovilizados, ya que la inmovilización brinda a las células una protección contra el efecto tóxico de las sustancias presentes en el medio (Mishra et al., 2001). Cuando se usan células inmovilizadas en estos procesos se logra incrementar la tasa global de biodegradación, debido a las altas densidades celulares que se alcanzan, además de incrementar la estabilidad y tolerancia de los microorganismos a los compuestos tóxicos (Godjevargova et al., 2003; Hanaki et al., 1994). Una característica fundamental de los microorganismos inmovilizados es su mayor tolerancia a altas concentraciones de sustrato. Esta cualidad es de especial interés cuando se emplean compuestos contaminantes tóxicos. En este sentido, los primeros trabajos de aplicación de microorganismos inmovilizados en el área ambiental para degradar compuestos fenólicos, demostraron que la inmovilización confiere una mayor resistencia a los microorganismos, incluso a altas concentraciones del contaminante, que resultan tóxicas cuando el microorganismo está libre en la fase líquida (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012). Es así que la inmovilización de microorganismos o células ha sido usada exitosamente en la biorremediación de numerosos compuestos tóxicos y aplicada a diferentes áreas incluyendo el tratamiento de efluentes y la remediación de químicos tóxicos. Los cultivos inmovilizados presentan ventajas adicionales: permiten su uso repetido, pueden separarse fácilmente del sistema de reacción, suelen tener mayor actividad y ser más resistentes a las condiciones ambientales adversas (pHs desfavorables, exposición a alta concentración de químicos tóxicos, etc.) (Ha et al., 2009; Junter y Jouenne, 2004; Willaert y Baron, 1996). El interés en sistemas inmovilizados ha crecido debido a las numerosas ventajas que estos ofrecen, ya que permiten acortar el tiempo del proceso de fermentación, incrementar la productividad y minimizar los costos de producción. Existen reportes comparando el uso de la inmovilización respecto al empleo de cultivos no inmovilizados en la degradación de contaminantes como el clorofenol (Lee et al., 1994) piridina (Rhee et al. 1996), cumafós

(Ha et al., 2009) y naftaleno (Manohar et al., 2001) entre otros. Entre las técnicas de inmovilización de células que se conocen, la adsorción y la captura en la matriz de un soporte polimérico son las más utilizadas. En la primera, los microorganismos se unen al soporte por interacciones iónicas en soportes como carbón activado o resinas de intercambio iónico (Ehrhardt y Rehm, 1985; Jack y Zajic, 1977). En cuanto a la segunda los materiales más usados para la formación de la matriz son gelatina, agar, gel de poliacrilamida, alginato de calcio, carragenina, quitosano o alcohol polivinílico. Otros materiales comúnmente usados como soporte para la inmovilización son los residuos lignocelulósicos, cuya ventaja adicional radica en la producción de azúcares durante su hidrólisis, lo que a su vez minimiza la generación de desechos (Zhang et al., 2009).

Los cultivos de células inmovilizadas han sido extensivamente aplicadas al tratamiento de efluentes contaminados, ya sean domésticos o industriales, conteniendo diferentes tipos de contaminantes como iones nitrito/nitrato, metales pesados o compuestos orgánicos recalcitrantes a la biodegradación (Junter y Jouenne, 2004). Posteriormente diferentes materiales se aplicaron a la inmovilización de hongos causantes de pudrición blanca a fin de mejorar la eficiencia en la remoción. Muchos tipos de matrices sólidas, tales como alginato de sodio, carbón activado, espumas de poliuretano y matrices poliméricas han sido usadas (Datta et al., 2013).

Uno de los materiales que ha sido comúnmente empleado en el proceso de inmovilización es el alginato. Éste es un componente de la pared celular de las algas pardas, está formado por dos tipos de unidades monoméricas: el ácido (1-4) D-manurónico y el ácido (1,4)-L-gulurónico. Cuando el alginato es expuesto a la presencia de iones calcio se forma una red de entrecruzamiento con los polímeros del ácido gulurónico, que permite la inmovilización de células (Smidsrød y Skjak-Brka, 1990).

Por otra parte la adición de silica a las perlas de alginato incrementa la resistencia mecánica de las mismas (Coradin et al., 2003). Otro material ampliamente usado como matriz de inmovilización es la esponja ya sea esta sintética o vegetal, en el caso de esta última, por su conformación de grandes poros permite que el micelio penetre más fácilmente aumentando la adhesión al soporte, además de ser un material biodegradable, económico y no contaminante.

Los hongos poseen un alto potencial para la degradación de contaminantes, a pesar de esto, poco se sabe aún sobre los mecanismos enzimáticos implicados en estos procesos de biodegradación. Son también aun escasos los estudios de biodegradación de contaminantes con hongos filamentosos inmovilizados, a pesar de que el uso de estos

microorganismos en la producción de enzimas de interés industrial ha sido exitoso (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012).

El fenol y los compuestos derivados, son contaminantes comunes encontrados en efluentes provenientes de operaciones industriales, como por ejemplo la producción de pulpa y papel, la preservación de madera, la fundición de metal y producción de pesticidas, y están clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA (código U188) (Atlow et al., 1984). El fenol es un sólido cristalino de color blanco utilizado para la preparación de resinas sintéticas, medicamentos, plaguicidas, colorantes sintéticos, sustancias aromáticas, aceites lubricantes, solventes, etc. Este compuesto químico no es fácilmente biodegradable y fue reportado como tóxico o inhibitorio del crecimiento de muchos microorganismos, incluso para aquellas especies que tienen la capacidad metabólica de usar el fenol como sustrato de crecimiento (Annachhatre y Gheewala, 1996). Los contaminantes ambientales constituyen una fuente de preocupación seria en todo el mundo debido a los peligros que entrañan para la salud de seres humanos y animales (Reddy y Mathew, 2001). Entre ellos, el uso masivo de clorofenoles condujo a la contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres (Valli y Gold, 1991). El 2,4,6-triclorofenol y los pentaclorofenoles usados extensivamente como preservantes de madera y pesticidas, y el 2,4-diclorofenol, precursor de la síntesis del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético contribuyen también al creciente aumento en los niveles de polución de aguas y suelos (Bordjiba et al., 2001). Los compuestos nitroaromáticos son contaminantes ampliamente distribuidos, generados por la producción industrial de insecticidas, herbicidas, fungicidas, colorantes y explosivos. Estos compuestos tienden a acumularse en el medio ambiente debido a su persistencia, toxicidad elevada y solubilidad en agua (Spain, 1995). El 4-nitrofenol, contaminante común del medio ambiente, proviene de la liberación industrial y la degradación de los plaguicidas a base de paratión (Zhang et al., 2012). El 4-nitrofenol se utiliza principalmente para la fabricación de medicamentos, fungicidas y colorantes, y para oscurecer cuero. El 2-nitrofenol es usado principalmente para producir colorantes, pinturas, caucho y fungicidas. La presencia del grupo nitro incrementa la resistencia de tales compuestos a la biodegradación de los análogos no sustituidos. Como consecuencia de ello, las aguas residuales que contienen estos compuestos tóxicos necesitan tratamiento cuidadoso antes de la descarga en los cuerpos de agua receptores (Spain y Gibson, 1991; Santos y Linardi, 2004). 2 y 4-nitrofenol se descomponen en el agua y la superficie del suelo, pero la degradación demora más en las zonas profundas.

Por lo tanto, se espera que permanezcan más tiempo en el suelo profundo de los sitios de descarga, en comparación con la superficie del suelo, e incluso pueden permanecer indefinidamente en los mismos así como en aguas subterráneas (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994; Terramoto et al., 2004; Tripathi et al., 2011).

Uno de los miembros del grupo de hongos causantes de pudrición blanca con reconocida capacidad lignocelulolítica y probada capacidad de degradativa de diferentes xenobióticos es *T. versicolor*. Este hongo fue evaluado en la remoción de fenol in vivo mostrando su eficiencia en la transformación de este contaminante. *T. versicolor* resultó capaz de crecer con fenol como única fuente de carbono (Yemendzhiev et al., 2008), remover fenol in vivo inmovilizado en un soporte natural (Carabajal et al., 2012), degradar una mezcla de compuestos aromáticos como fenol (0.2 g l^{-1}), resorcinol (0.1 g l^{-1}), p-cresol (0.1 g l^{-1}), y o-nitrofenol (0.14 g l^{-1}) (Yemendzhiev et al., 2011) y reducir el color y la concentración de compuestos aromáticos en el licor negro (Font et al., 2003). También ensayos con sus enzimas purificadas han mostrado una exitosa remoción de pentaclorofenol en bajas concentraciones (Ullah y Evans, 1999), y la enzima lacasa purificada en presencia de mediadores químicos demostró ser capaz de oxidar el antraceno (Johannes et al., 1996). Por otra parte hasta el momento son escasas las investigaciones sobre la capacidad de *T. versicolor*, para degradar nitrofenoles. Solo dos reportes de Yemendzhiev et al. (2011) han evaluado la capacidad de este hongo de degradar y crecer en medio sintético con nitrofenol, encontrando resultados promisorios en la remoción de este contaminante. Es por esto y por la demostrada capacidad de degradar una amplia variedad de contaminantes, que *T. versicolor* se presenta como un excelente modelo para estudios de biorremediación de nitrofenoles.

Aunque los métodos convencionales para remoción de este tipo de contaminantes existen, normalmente son costosos, puede formar subproductos peligrosos y con frecuencia son aplicables sólo a un rango de concentraciones limitada. Uno de los objetivos de la biotecnología es el desarrollo de métodos de biorremediación rentables y ambientalmente seguros, eficaces para sustituir o complementar adecuadamente las tecnologías existentes, así como para proporcionar soluciones para la recuperación de las fuentes de agua contaminadas (Ryan et al., 2007). La mayoría de la información sobre el metabolismo de nitrofenoles involucra a bacterias (Spain y Gibson, 1991; Venkateswarlu y Spain, 1998; Zhang et al., 2012). El conocimiento correspondiente sobre los hongos filamentosos es aún limitado.

Objetivos:

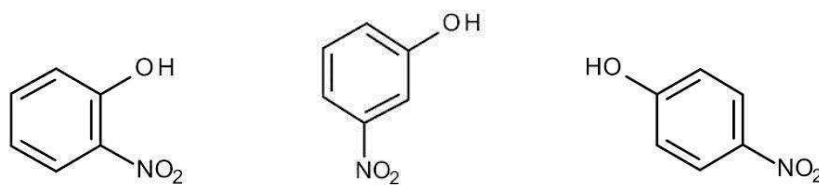
- Evaluar la capacidad de *T. versicolor* BAFC 2234 para transformar fenol y nitrofenol in vivo.
- Evaluar la habilidad de *T. versicolor* para transformar fenol inmovilizado en dos diferentes soportes.
- Evaluar la capacidad y tolerancia de cultivos inmovilizados in vivo para degradar fenol en altas concentraciones.
- Evaluar la capacidad de enzimas purificadas de *T. versicolor* para degradar in vitro compuestos de tipo fenólico (fenol y nitrofenoles) presentes normalmente en efluentes industriales.

2 Materiales y métodos

2.1 Transformación de fenol y nitrofenol por T. versicolor in vivo

Estudios de la transformación de fenol y 2-, 3-, y 4-nitrofenol in vivo se llevaron a cabo en medio líquido GA en agitación (100 rpm at 24°C). En condiciones de esterilidad se agregaron a los medios de cultivo fenol (concentración final 7 mM) o nitrofenol (concentración final 0.5 mM) a los 7 días posteriores a la inoculación. Se emplearon Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 80 ml de medio y se inocularon con micelio pre cultivado en placa en medio agar-malta a 24°C por 10 días. El contenido de una placa fue homogeneizado en 80 ml de agua estéril y la suspensión de micelio se usó para inocular los cultivos líquidos (5% v/v). Los controles consistieron en medio GA sin fenol o nitrofenol y medio sin inocular. Cada 2 o 3 días se tomaron muestras en forma estéril (1 ml). Cada muestra fue centrifugada ($10.000 \times g$ por 8 min) a 4°C. El sobrenadante se empleó para cuantificar la concentración de fenol por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los cultivos fueron cosechados al día 11 y 14 de crecimiento para nitrofenol y fenol respectivamente, y se cuantificó la biomasa determinando el peso seco de los cultivos luego de filtrarlos con papel de filtro y secarlos en estufa (70°C) hasta peso seco constante. Los cultivos suplementados con 4-nitrofenol se seleccionaron para análisis posteriores. A fin de investigar los mecanismos involucrados en la degradación de nitrofenol, un inhibidor de la citocromo P-450, el

reactivo piperonil butoxido (PB), fue adicionado a los cultivos seleccionados en una concentración final de 3 mM.



Estructuras químicas de 2-, 3- y 4-nitrofenol

2.2 Transformación de fenol por *T. versicolor* inmovilizado en soporte sintético y natural

A fin de evaluar la transformación de fenol, *T. versicolor* fue inmovilizado en dos soportes diferentes, un soporte sintético conformado por una matriz de alginato-sílica, y un soporte natural que consistió en esponja vegetal *Luffa aegyptiaca*. Para la constitución del soporte sintético, el hongo fue cultivado en medio líquido sintético GA, y luego fue procesado y encapsulado en alginato. Para ello, luego de 15 días de crecimiento, el micelio fue molido y se conformó una suspensión de pequeñas piezas de micelio en alginato, en una proporción 2% micelio y 1% de alginato. Esta suspensión fue luego resuspendida en una solución acuosa 0.1 M de CaCl₂ conformando pequeñas gotas. Luego de 10 minutos de agitación las esferas conformadas (4-5 mm de diámetro) fueron colectadas por filtración. Se testearon 4 sistemas: encapsulación en alginato-sílica (AlgSil-a y AlgSil-i) (Fig. 1-a) y encapsulación en alginato (Alg-a y Alg-i) (Fig. 1-b), donde la última letra indica si se trata de micelio activo o de micelio inactivado. El primer sistema consistió en la polimerización de sílica en presencia de nanopartículas de sílica comercial (Ludox HS40 from Aldrich), dando lugar a una estructura monolítica nanoporosa. Para esto, las esferas de alginato y micelio se distribuyeron en número de 3 en contenedores plásticos cilíndricos (0.6 cm diámetro, 1 cm altura). El procedimiento fue realizado a temperatura ambiente adicionando a cada contenedor 3 volúmenes de silicato de sodio (0.83 M in Si (IV)) y 1 volumen de sílica coloidal comercial, ajustada a pH 6.5. El segundo sistema consistió en esferas libres. En total cada uno de estos sistemas contenía 12 esferas de alginato. Como control el micelio se inactivó previamente mediante autoclavado y luego fue encapsulado como el micelio activo. Por

otra parte, *T. versicolor* fue inmovilizado en el endocarpo de *L. aegyptiaca*, material de soporte natural (Fig. 2). Para ello el hongo fue cultivado sobre esta matriz en medio GA como en el caso anterior. El cultivo se llevó a cabo en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 30 ml de medio y 2 piezas de esponja (1 x 1 cm). Los cultivos fueron incubados en condiciones estáticas a 28°C por 15 días. Cultivos inactivados mediante autoclavado sirvieron de controles para determinar la pérdida por absorción en el micelio y la matriz de esponja.

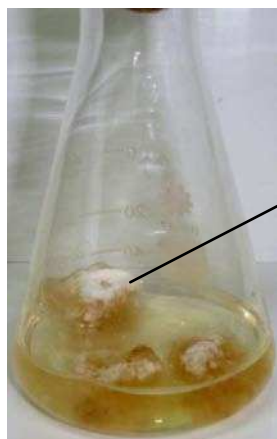


Fig. 1: *T. versicolor* inmovilizado en alginato (der.) y en alginato-sílica (izq.)

Fig. 2: *T. versicolor* inmovilizado en el endocarpo de *L. aegyptiaca*

Finalizados los procesos de inmovilización en cada uno de los sistemas mencionados, se evaluó la remoción de fenol en dos ciclos sucesivos. Se partió de una concentración inicial de 10 mM de fenol. Al comienzo del segundo ciclo, se agregó fenol al medio en la misma concentración. La remoción de fenol se siguió en condiciones estáticas por un periodo de 15 días. En cada caso se cuantificó la biomasa. Finalizados los ensayos se escogió el mejor sistema de inmovilización y luego fue evaluado en una concentración de fenol más elevada (15 mM) bajo 3 ciclos de remoción de fenol. Para esto, el hongo fue inmovilizado en el soporte de esponja natural cultivando a la cepa en medio jugo de tomate (Albi & Co., Germany) y agua destilada (50:50 v/v). El medio jugo de tomate es un medio rico en compuestos fenólicos, como los flavonoides, taninos y tocoferoles (Hertog et al., 1992), así como en hidrocarburos no saturados, como los carotenoides y fitoenos (Khachik et al., 1995). Diferentes grupos de trabajo mostraron que el jugo de tomate diluido sólo o en combinación con sólidos naturales puede estimular la producción de las oxidoreductasas extracelulares, tales como MnP y lacasa en agaricales (Rohene-Soustrade et al., 1992; Ullrich et al., 2004). En este caso el cultivo se llevó a

cabo en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 200 ml de medio y 3 piezas de esponja (150 x 250 mm). Los cultivos fueron incubados en agitación a 100 rpm y 24°C. Se cosecharon luego de 15 días de crecimiento. Para estimular la producción de enzimas se agregó al medio de cultivo antes de autoclavar MnCl_2 and CuSO_4 (concentración final 250 μM). El fenol se agregó en tres tiempos distintos cuando su concentración disminuyó en el medio un 60-70% y fue evaluado por un periodo de 23 días.

2.3 Transformación de nitrofenol por *T. versicolor* inmovilizado en *L. aegyptiaca*

Al igual que en el caso anterior, se evaluó la remoción de 4-nitrofenol por el hongo inmovilizado en el soporte de esponja vegetal. *T. versicolor* fue inmovilizado en el endocarpio de *L. aegyptiaca* en el medio jugo de tomate. Posteriormente los cultivos se cosecharon y el micelio inmovilizado se transfirió a una solución fresca de nitrofenol (1 mM). La remoción de 4-nitrofenol se siguió bajo condiciones estáticas durante un período de 5 días a 24°C. Cultivos inactivados sirvieron como control.

2.4 Evaluación de enzimas

La actividad lacasa se determinó siguiendo la oxidación de ABTS usando 50 μl de enzima en 50 mM de buffer citrato-fosfato (pH 4.5, 25°C) a 420 nm ($\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Bourbonnais et al., 1995). La actividad MnP se midió a 270 nm ($\epsilon_{270}=11590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) siguiendo la formación de complejos Mn^{3+} en buffer malonato de sodio 50 mM (pH 4.5) conteniendo MnCl_2 0.5 mM, H_2O_2 0.2 mM y 50 μl de muestra enzimática. La reacción se inició a 25°C al adicionar H_2O_2 (Wariishi et al., 1992). La actividad LiP fue medida con veratril alcohol (Kirk et al., 1986) siguiendo la formación de veratril aldehído a 310 nm ($\epsilon_{310}=9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en buffer tartrato de sodio 50 mM (pH 3.0), veratril alcohol 5 mM, H_2O_2 0.2 mM y 100 μl de la muestra enzimática; la reacción se inició con H_2O_2 . La actividad versatil peroxidasa (VP) se midió a 598 nm ($\epsilon_{598}=47600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) monitoreando la conversión del colorante azoico Reactive Black 5 en buffer tartrato de sodio 50 mM (pH 3.0), conteniendo 0.1 mM del Reactive Black 5 y H_2O_2 0.2 mM (Heinfling et al., 1998). La actividad enzimática se expresó en unidades

internacionales (U) definidas como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de producto por minuto ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

2.5 Estimación de fenol y nitrofenol

La concentración de fenol fue estimada empleando dos métodos diferentes. En una primera instancia se determinó el contenido de fenol usando el método de Folin-ciocalteau descrito en el capítulo anterior. Luego un método más específico de cuantificación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), fue empleado para las posteriores determinaciones. Este último consistió en el sistema de HPLC Agilent; (Agilent, 1200 series Waldbronn, Germany) equipado con un detector de arreglo de diodos y una columna difenilo ($100\text{ mm} \times 2.0\text{ mm}$, Varian, Darmstadt, Germany). Las muestras tomadas (1 ml) fueron centrifugadas y transferidas a viales de 2 ml para HPLC. Los análisis se realizaron a 50°C empleando como fase móvil una mezcla de ácido fosfórico (20 mM) y acetonitrilo (90:10), a una tasa de flujo de 0.4 ml min^{-1} y bajo condiciones isocráticas. Las muestras eluidas se detectaron a 270 nm. La concentración de nitrofenol en las muestras fue determinada por HPLC bajo las mismas condiciones descritas arriba, pero empleando como fase móvil una mezcla de ácido fosfórico y acetonitrilo en proporciones 82:18 v/v.

2.6 Ensayos de fitotoxicidad

La fitotoxicidad del fenol y el 4-nitrofenol fue determinada de acuerdo al método descrito por Zucconi et al. (1981) usando semillas de *Lepidium sativum*. Las semillas fueron incubadas por 48 hs a 25°C con las respectivas soluciones de fenol (10 mM) o 4-nitrofenol (1 mM) y la solución tratada durante el periodo de 4 o 23 días con T. versicolor inmovilizado en la esponja vegetal en forma separada. El índice de germinación (GI) fue calculado de acuerdo a la expresión: $GI = (G/G_0) / (L/L_0) \times 100$, donde G_0 y L_0 son, respectivamente, el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula de las semillas control (regadas con agua destilada), y G y L los respectivos porcentajes de las semillas regadas con la solución tratada.

2.7 Conversión de fenol y 2-, 3- y 4-nitrofenol in vitro

Para investigar la participación de las oxidoreductasas lignolíticas en la degradación de fenol y 2-, 3- y 4-nitrofenol, se llevaron a cabo experimentos in vitro. Las mezclas de reacción (500 μ l) se constituyeron con una solución de nitrofenol (0.25 mM) y buffer citrato de sodio (250 μ M, pH 4.5), buffer malonato de sodio (250 μ M, pH 4.5) o buffer tartrato de sodio (250 μ M, pH 3.0), para la conversión con enzimas lacasa, MnP o VP, respectivamente. La reacción lacasa se inició mediante la adición de la lacasa purificada de *T. versicolor* (1 U. ml^{-1} concentración final), y las reacciones de MnP y VP mediante la adición de las respectivas enzimas purificadas (1 U. ml^{-1} concentración final) y H_2O_2 (500 μ M concentración final). Para el caso de la evaluación con nitrofenol, el total de la enzima se dividió en tres cantidades iguales; añadiendo cada parte cada 3 hs (así como el H_2O_2) y fue agitada a temperatura ambiente. Los controles correspondientes no contuvieron enzima. Las reacciones se detuvieron después de 9 hs tras la adición de ácido tricloroacético (TCA) (5%). Para la evaluación del fenol, las corridas cromatográficas se evaluaron cada hora durante el periodo de cuatro horas.

Para la cuantificación, los estándares se prepararon mediante dilución de las soluciones madre. La concentración de los productos en las muestras se calculó utilizando ecuaciones de regresión lineal de las curvas de calibración elaboradas previamente a partir de soluciones patrón. La reacción se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un instrumento Agilent Serie 1200 equipado con un detector de red de diodos (DAD) y un espectrómetro de masas de ionización por electrospray (ESI/MS) (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Germany).

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en una columna Luna C18 fase inversa (150 mm x 2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania), la elución tuvo lugar a 0.35 ml min^{-1} y 40°C con formiato de amonio acuoso 0.01% v/v (pH 3.5) / acetonitrilo, en una proporción 95:5 durante 5 min, seguido de un gradiente lineal de 25 min de acetonitrilo al 100%.

3 Resultados

3.1 Transformación de fenol in vivo

T. versicolor fue capaz de remover completamente la totalidad del fenol adicionado al cultivo (7 mM) luego de 96 hs de incubación (Fig. 3), la lacasa fue la principal actividad lignolítica detectada en estos cultivos durante el periodo de evaluación. La producción de MnP fue considerablemente menor (max 8.5 U l⁻¹, detectada a los 7 días de la adición de fenol, datos no mostrados).

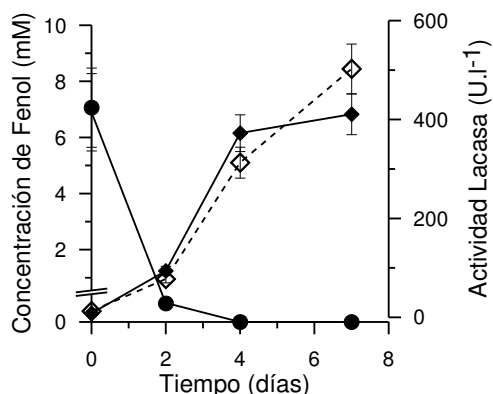


Fig. 3: Remoción in vivo de fenol (círculos) y actividad lacasa producida por *T. versicolor* (rombos). Línea de puntos: actividad lacasa en el medio control

El fenol a la concentración 7 mM no resultó tóxico para los cultivos de *Trametes*, y la producción de biomasa fue similar en el cultivo suplementado y en el control ($4.46 \pm 0.85 \text{ g l}^{-1}$ vs. $4.60 \pm 0.004 \text{ g l}^{-1}$, respectivamente). Luego de la adición de fenol, la producción de lacasa alcanzó un máximo de 404.4 U l^{-1} al día 7, mientras que sólo trazas de actividad MnP (8.5 U l^{-1}) fueron detectadas. En el cultivo control sin fenol, la actividad de lacasa alcanzó un máximo de 511.5 U l^{-1} y no se detectó actividad MnP.

3.2 Transformación de nitrofenol in vivo

T. versicolor fue capaz de remover 2-, 3- y 4-nitrofenol con distinta eficiencia creciendo en medio de cultivo líquido (95%, 92% y 98,4% para 2 -, 3 - y 4-nitrofenol, respectivamente). La remoción de nitrofenol y la cinética de producción de lacasa en los distintos medios de cultivo se muestran en las Figs. 4 y 5 respectivamente.

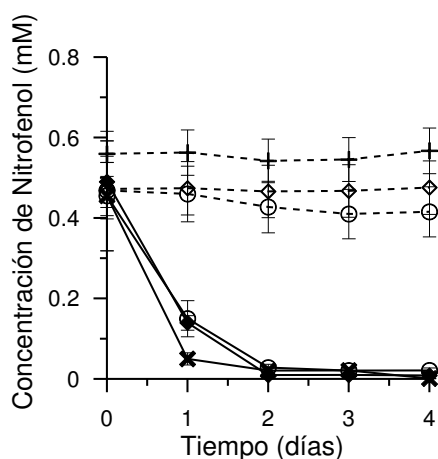


Fig. 4: Remoción in vivo de 2 nitrofenol (círculos) 3 nitrofenol (rombos) y 4 nitrofenol (cruces) por *T. versicolor*.

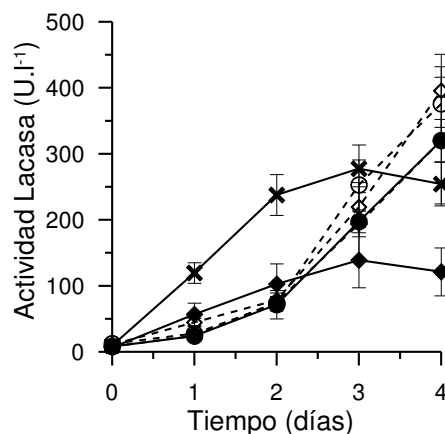


Fig. 5: Actividad lacasa producida por *T. versicolor* durante la remoción de 2 nitrofenol (círculos) 3 nitrofenol (rombos) y 4 nitrofenol (cruces).

Los controles abióticos no mostraron ninguna variación significativa en su concentración de nitrofenol (0.5 ± 0.043 mM). La actividad de la enzima lignolítica más frecuente en cultivos de *T. versicolor* suplementado con nitrofenol fue lacasa (actividades máximas: 317.78; 127.44 y 286.35 U l⁻¹ para 2-, 3- y 4-nitrofenol respectivamente), ésta se incrementó concomitantemente con la disminución de la concentración de nitrofenol. Actividades MnP o LiP no fueron detectadas en el medio de cultivo (datos no mostrados) pero sí se registró actividad VP en el medio suplementado con 4-nitrofenol, alcanzando la misma máximos de 2.8 U l⁻¹. En los cultivos control sin nitrofenol, las actividades lacasa máximas fueron (376.57; 379.63 y 316 U l⁻¹) detectándose las mismas en el último día de muestreo. El crecimiento de *T. versicolor* en presencia de 2-, 3- y 4-nitrofenol 0,5 mM mostró sólo diferencias menores (Tabla 1).

Tabla 1: Biomasa producida por *T. versicolor* en los medios GA suplementados con 2, 3 y 4 nitrofenol así como en los medios control (sin nitrofenol).

Nitrofenol	Biomasa (g l ⁻¹)	
	GA+nitrofenol	control
2	4.41 ± 0.11	3.38 ± 0.15
3	4.48 ± 0.16	4.11 ± 0.13
4	4.19 ± 0.13	3.57 ± 0.15

Entre ellos, se eligió al 4-nitrofenol para ensayos posteriores. No se observaron cambios en la capacidad de la degradación fúngica cuando se añadió el inhibidor de la citocromo P-450 piperonil butóxido (3 mM) (Fig. 6).

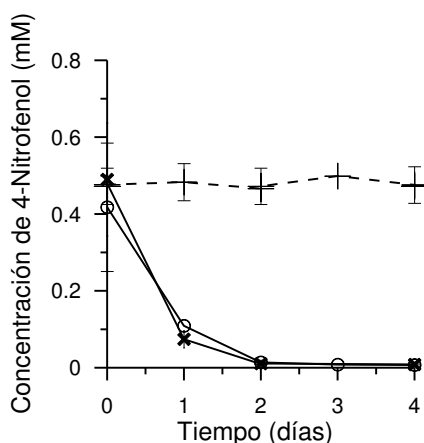


Figura 6: Remoción in vivo de 4-nitrofenol (cruces) y 4-nitrofenol en presencia del inhibidor de la citocromo P-450 piperonil butóxido (círculos). Línea punteada corresponde al control

3.3 Transformación de fenol por *T. versicolor* inmovilizado en soporte sintético y natural

T. versicolor inmovilizado en los dos soportes, silica gel y esponja, resultó efectivo en la remoción de fenol. La inmovilización en el soporte de silica-gel (Alg-a) removió 41% mientras que el hongo inmovilizado en la matriz (AlgSil-a) removió 48%. Por su parte, los sistemas inactivos removieron 33% (Alg-i) y 41% (AlgSil-i) del fenol adicionado a la solución. En consecuencia, la transformación efectiva del fenol fue 8 y 7% en la Alg-

a y AlgSil-a respectivamente. Por otra parte *T. versicolor* inmovilizado en esponja natural obtenida de los frutos de *L. aegyptiaca* pudo remover el 87% del fenol y 30% de esta remoción se atribuyó a la absorción en el micelio y en el material de soporte (esponja). En base a los resultados obtenidos este sistema de inmovilización fue escogido como material para evaluar el desempeño de *T. versicolor* en concentraciones de fenol más elevadas (15 mM). El 71, 62, 74 y 73% del fenol adicionado en esta elevada concentración fue transformado en tres ciclos repetidos en un periodo de evaluación de 23 días (el fenol fue adicionado luego de 3, 10, 16 y 21 días, respectivamente) (Fig. 7). En el control, una disminución del contenido de fenol fue observado únicamente en el primer ciclo. Luego de esto la variación en la concentración no fue significativa, lo que puede atribuirse a una saturación del sistema de inmovilización. Este comportamiento llevó a que no volviese a adicionarse fenol al sistema control. La disminución del contenido de fenol del primer ciclo correspondió al 39% comparado con el hongo activo y fue atribuido a adsorción por parte del micelio, mientras que la degradación enzimática fue responsable por el 32% de la remoción del fenol del medio.

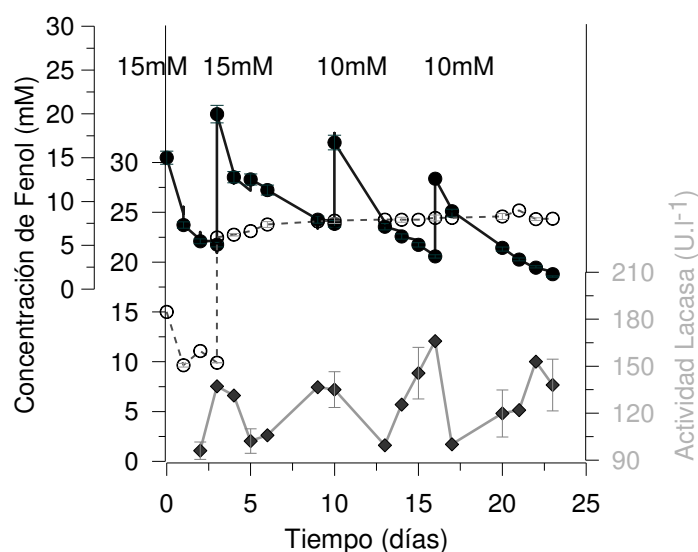


Fig. 7: Ciclos de remoción de fenol (círculos) y producción de actividades lacasa (diamantes) por *T. versicolor* inmovilizado en *L. aegyptiaca*. Los valores en la parte superior indican la concentración fenol agregado al sistema de remoción a lo largo del tiempo

En ciclos subsiguientes no se observó absorción (no se detectaron variaciones significativas en el contenido de fenol del control). La biomasa total fue de 15 mg (± 0.1 mg) en la primera experiencia y 40 mg (± 0.1 mg) en la segunda. La lacasa fue la única

enzima relevante detectada. Su actividad primero decreció con la adición del contaminante pero luego aumentó nuevamente en correspondencia con la remoción del fenol. El efecto tóxico del fenol sobre la actividad lacasa, se observó cada vez que se adicionó fenol al sistema. Precipitados de color negro amarronado se detectaron desde el tercer día de evaluación en la solución de fenol.

La remoción de 4-nitrofenol se ensayó también con *T. versicolor* inmovilizado en esponja natural en una concentración de nitrofenol 1 mM. El hongo inmovilizado removió el 97% del contaminante luego de 3 días y el 100% a los 5 días (Fig. 8).

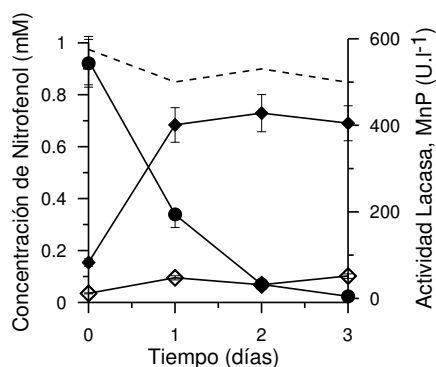


Fig. 8: Concentración de 4-nitrofenol (círculos) y producción de actividades lacasa y MnP (diamantes negros y blancos respectivamente) por *T. versicolor* inmovilizado en *L. cylindrica*

Durante el proceso esta cepa produjo lacasa (con actividades máximas de 450.8 U.l⁻¹) como principal enzima lignolítica. Sin embargo, en este caso, también secretó MnP (actividad máxima 45.4 U l⁻¹) y VP (2.1 U l⁻¹). La actividad LiP no fue detectada durante el periodo de evaluación. No se detectaron cambios en la concentración de la solución de nitrofenol en los controles (cultivos inactivados mediante autoclavado).

3.4 Ensayos de fitotoxicidad

El índice de germinación se empleó para evaluar la fitotoxicidad del fenol y el 4-nitrofenol usando semillas de *L. sativum*. El índice fue igual a cero para las semillas regadas con fenol 15 mM al igual que para las tratadas con las soluciones control (hongo inmovilizado y autoclavado). *T. versicolor* fue capaz de reducir la toxicidad de la solución de fenol luego del tratamiento apropiado. Las semillas mostraron un índice de germinación del 63% (± 5.7) (Fig. 9). En el caso del nitrofenol, *T. versicolor* también

fue capaz de reducir la fitotoxicidad de la solución, mostrando estas semillas un índice de germinación del 72% (± 5.5).

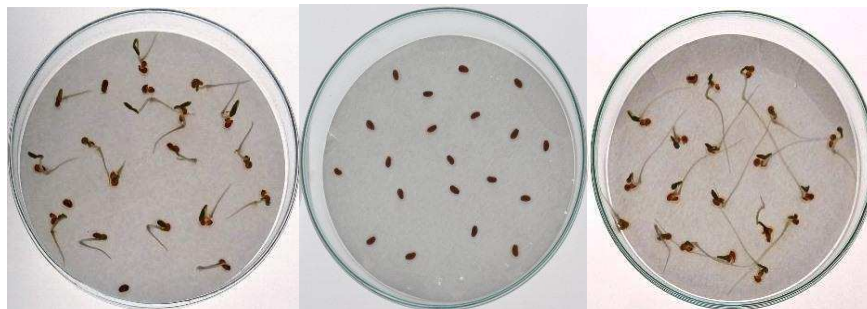


Fig. 9: Ensayo de fitotoxicidad empleando semillas de berro. De derecha a izquierda: solución de fenol tratada con *T. versicolor*, solución de fenol 10 mM y control.

3.5 Transformación de fenol y nitrofenol *in vitro*

Se investigó la transformación del fenol por acción de las enzimas purificadas lacasa, MnP de *T. versicolor* y la del 2-, 3- y 4-nitrofenol adicionalmente con la enzima VP purificada de la misma cepa, a fin de evaluar su posible participación en la conversión de dichos compuestos químicos. En este segundo ensayo, los diferentes porcentajes de remoción se obtuvieron después de 9 hs de incubación con las respectivas enzimas lignolíticas. La VP mostró la más alta eficiencia en la transformación del contaminante, removió el 55%, 16% y 50% del 2-, 3- y 4-nitrofenol, respectivamente (Fig. 10). Aunque la lacasa fue la principal enzima detectada en cultivos líquidos suplementados con nitrofenol, la enzima purificada no fue capaz de transformar este contaminante. Por otro lado, la MnP redujo hasta un 32% y 40% la concentración de 2- y 4-nitrofenol, pero no disminuyó la concentración del 3-nitrofenol (datos no presentados). Los ensayos realizados con HPLC-MS revelaron que la biotransformación de 4-nitrofenol con VP dió como resultado la formación de 2,4-dinitrofenol y un dímero, el dihidroxidinitrobifenil. El dímero eluyó después que el 2,4-dinitrofenol con tiempo de retención de 19.23 min. El respectivo espectro UV-Vis muestra el pico típico de nitrofenol centrados alrededor de 317 nm (inserto 1: peso molecular correspondiente de

277.18 m/z) (Fig. 10). El 2,4-dinitrofenol apareció después del 4-nitrofenol con tiempo de retención de 18.07 min (recuadro B: peso molecular correspondiente de 185.0 m/z). En el caso del 2-nitrofenol, también se observó la formación del 2,4-dinitrofenol como producto de reacción, eluyendo el mismo a los 17.96 min. Del análisis de 3-nitrofenol con HPLC-MS no se observaron productos de reacción. Es posible que haya tenido lugar la formación de productos no solubles tales como oligómeros, no detectables con HPLC-MS o que el grado de transformación (16%) haya sido muy bajo.

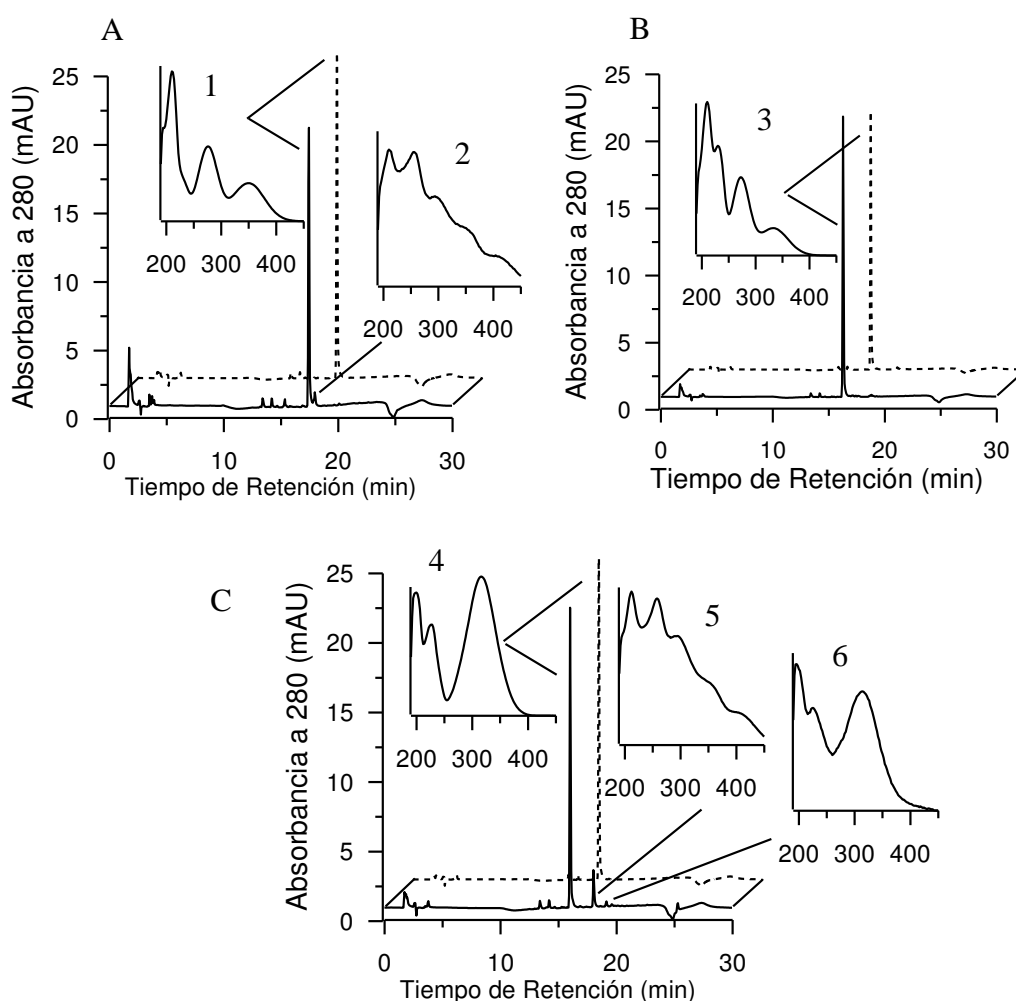


Fig. 10: Transformación de 2- nitrofenol (A), 3-nitrofenol (B) y 4-nitrofenol (C) con VP purificada de *T. versicolor* luego de 9 horas de evaluación. En cada gráfica se muestran además los correspondientes espectros UV-visible de los picos de nitrofenol (insertos 1, 3 y 4) y productos (insertos 2.5 y 6)

En el análisis de fenol, MnP y lacasa redujeron la concentración de fenol. La lacasa de *T. versicolor* removió 84% del fenol dentro de 4 hs, mientras que un 43% fue removido

por la MnP (Fig. 11). El control se llevó a cabo bajo las mismas condiciones sin el agregado de enzimas, y no se observaron variaciones significativas en la concentración de fenol. Pusimos a prueba la capacidad de las dos enzimas purificadas para la conversión de fenol. Ambas enzimas fueron eficientes reduciendo la concentración de fenol, pero la lacasa mostró mayor capacidad en la remoción del mismo.

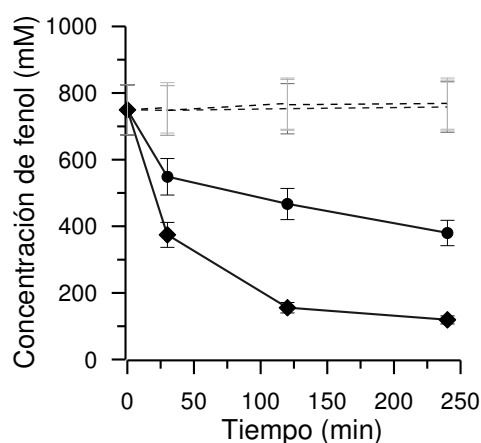


Fig. 11: Transformación del fenol por acción de lacasa (rombos) y MnP (círculos) purificada de *T. versicolor*. Los controles sin enzima adicionada se muestran en líneas de puntos.

4 Discusión

Se evaluó la capacidad de *T. versicolor* de remover dos contaminantes comúnmente encontrados en efluentes industriales, fenol y nitrofenol, en sus tres formas, 2-, 3- y 4-nitrofenol. Esta cepa demostró una elevada eficiencia de remoción. La principal enzima lignolítica involucrada fue lacasa. Del mismo modo, en ensayos realizados por Font et al. (2003) cuando pellets de *T. versicolor* se aplicaron al tratamiento del licor negro, sólo se detectó actividad lacasa. Un caso similar fue observado por Marco-Urrea et al. (2009) quienes demostraron recientemente que la lacasa fue la única enzima producida en los cultivos de *T. versicolor* suplementados con triclorobenceno. Dado que la oxidación de fenol es generalmente un proceso inductivo, la producción de enzimas puede variar fuertemente al alterar las condiciones (Udayasoorian y Prabu, 2005). En los hongos causantes de pudrición blanca, como *Pleurotus* spp., *Phanerochaete laevis* o *T. versicolor*, la actividad lacasa aumentó en respuesta a la adición de compuestos fenólicos (Tripathi et al., 2011). En la presente experiencia la producción de lacasa

estuvo relacionada directamente con la remoción de nitrofenol y fenol en los sistemas evaluados, aumentando concomitantemente con la remoción de dichos contaminantes y viéndose estimulada su producción en presencia de 4-nitrofenol. Por otra parte, la producción de MnP fue considerablemente menor (máx. 8.5 U l^{-1} , detectado a los 7 días de la adición de fenol, datos no mostrados) o nula. Este resultado no fue sorprendente dado que la producción de la enzima MnP se ve usualmente estimulada con la presencia de iones Mn^{2+} (Bonnarme y Jeffries, 1990).

La cepa argentina de *T. versicolor* BAFC 2234 fue capaz de remover el 100% de fenol adicionado en una concentración 7 mM luego de 96 hs. Y esta misma cepa inmovilizada en el soporte natural de esponja vegetal logró remover concentraciones aún más elevadas de fenol y redujo la fitotoxicidad de las respectivas muestras tratadas.

El empleo de este tipo de soportes naturales brinda la posibilidad de realizar ciclos sucesivos de degradación, empleando concentraciones de fenol tan altas como 10 mM, permitiendo su uso en biorremediación. En ambos casos el mecanismo de remoción involucrado fue la polimerización (Fig.12).

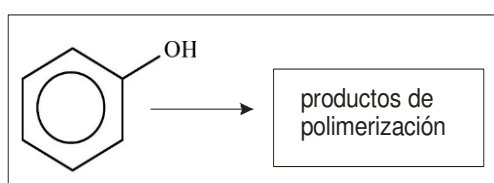


Fig. 12: Esquema de polimerización de fenol, representado como posible mecanismo de remoción de fenol.

Ryan et al. (2007) encontraron que el incremento en la concentración de fenol en el medio de cultivo de *T. versicolor* provoca una disminución en la biomasa del mismo. En este trabajo ninguno de los contaminantes afectaron el crecimiento de *T. versicolor*. Además la habilidad de *T. versicolor* para crecer en concentraciones superiores a 15 mM de fenol es una fuerte evidencia de su resistencia y potencial en biorremediación. En el caso del nitrofenol, es sabido que compuestos nitroaromáticos como éste, son recalcitrantes y potencialmente tóxicos para los hongos (Spain, 1995; Teramoto et al., 2004). Sin embargo, la relativamente baja concentración empleada aquí (0.5 mM) no tuvo un efecto tóxico marcado en la biomasa final obtenida, pero pudo haber influido en la producción de enzimas lignolíticas, considerando que la actividad VP fue detectada luego de que el 4-nitrofenol fuera adicionado al medio. La lacasa fue la principal

enzima lignolítica producida por esta cepa. Los títulos fueron mayores en los cultivos suplementados con 4-nitrofenol que en los controles (cultivos sin fenol) durante los primeros días de evaluación. Los compuestos aromáticos son conocidos por actuar como elicitores/inductores de la producción de lacasa por diversos hongos (Elisashvili et al., 2010). Aquí la adición de nitrofenol pudo haber estimulado la producción de lacasa por *T. versicolor*. Las enzimas lignolíticas (MnP, LiP, lacasa) se conocen por ser responsables de la oxidación e incluso mineralización de compuestos nitroaromáticos (Tripathi et al., 2011). Las peroxidasas, sumada a su implicancia directa o en forma alternativa, pueden desempeñar un papel indirecto en el proceso de degradación, a través de una reacción en cadena que conduce a la degradación de los contaminantes mediante la generación de radicales libres, tales como radicales fenoxi, que a su vez, pueden atacar moléculas muy recalcitrantes que normalmente no son atacadas directamente por acción enzimática (Anastasi et al., 2010). *T. versicolor* es conocido por producir lacasa, MnP y LiP (Dodson et al., 1987; Paice et al., 1993; Bourbonnais et al., 1995). Recientemente la actividad VP ha sido detectada en este género (Ruiz-Dueñas et al., 2008). *T. versicolor* ha sido empleado exitosamente en la degradación de compuestos aromáticos tales como triclorobencenos (Marco-Urrea et al., 2009), varios clorofenoles (Ullah y Evans, 1999) y p-cresol (Ryan et al., 2007). Posiblemente también sea capaz de remover nitrofenol por medio de dos vías diferentes. Una de las cuales tiene lugar extracelularmente mediante enzimas lignolíticas (Scheibner et al., 1997) y la otra que en forma intracelular convierte nitrofenol, por ejemplo mediante citocromo P-450s, fenol hidrolasas inespecíficas y/o oxidoreductasas (Neujahr y Kjellén, 1978; Scheibner et al., 1997; Teramoto et al., 2004).

Dada la mayor producción de lacasa detectada en cultivos con 4-nitrofenol y la investigación llevada a cabo hasta el momento, se escogió este compuesto xenobiótico para evaluar el efecto del piperonol butóxido, un inhibidor del citocromo P-450. Aunque se ha informado de la implicancia del citocromo P-450 en el metabolismo de 4-nitrofenol en otro hongo ligninolítico, *P. chrysosporium* (Teramoto et al., 2004), la transformación de 4-nitrofenol por *T. versicolor* no fue afectada por la adición del piperonol butóxido al medio de crecimiento, sugiriendo que el citocromo P-450 no está involucrado en la degradación de nitrofenol por esta cepa o puede ser evitado por enzimas no inhibidas. Sin embargo fenol hidroxilasas y/o nitroreductasas, pueden estar involucradas en el proceso, pero su rol no fue investigado en el presente trabajo.

Por otra parte, se pudo mostrar que las enzimas purificadas de *T. versicolor* MnP y VP fueron capaces de degradar 2- y 4-nitrofenol in vitro en porcentajes iguales o cercanos al 50%. El hongo produjo lacasa como principal enzima lignolítica, pero esta enzima purificada no fue capaz de degradar el contaminante. Sin embargo, la acción sinérgica de lacasa, MnP y VP en la degradación de nitrofenol in vivo no se puede descartar, considerando que mediadores naturales pueden estar presentes en los fluidos extracelulares del hongo y desempeñar un papel en la degradación de nitrofenol por la lacasa. Las lacasas catalizan la oxidación de una amplia gama de compuestos fenólicos, extendiéndose su rango de sustratos a los compuestos no fenólicos cuando se está en presencia de compuestos de bajo peso molecular que actúan como mediadores (Bourbonnais y Paice, 1990). La adición de mediadores de la enzima lacasa no fue evaluada en este trabajo. Por otra parte, la lacasa puede oxidar nitrocatecol que se produce intracelularmente por monooxigenasas (Ullrich y Hofrichter, 2007). La lacasa de *T. trogii* catalizó la oxidación de 4-nitrocatecol (Garzillo et al., 1998). Las peroxidasas lignolíticas son capaces de romper los compuestos modelo representativos de los principales tipos de enlaces en la lignina debido a sus altos potenciales redox y mecanismos catalíticos especializados. Las peroxidasas lignolíticas de los hongos de pudrición blanca incluyen LiP, MnP, y VP (Ruiz- Dueñas et al., 2009). VP oxida Mn^{2+} , al igual que lo hace la MnP, y también compuestos aromáticos de elevado potencial redox al igual que lo hace la LiP. Por otra parte, VP oxida directamente compuestos de alto potencial redox, por ejemplo, el colorante Reactive Black 5, el cual la LiP puede oxidar sólo en la presencia de alcohol veratrílico (Ruiz- Dueñas et al., 2009). La VP no requiere de mediadores para oxidar compuestos fenólicos o no fenólicos tales como lignina, pesticidas, compuestos de alto potencial redox, colorantes poliméricos o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Ruiz- Dueñas et al., 2009). En este trabajo demostramos por primera vez la habilidad de la VP de *T. versicolor* para transformar 2- y 4-nitrofenol. Luego de un tiempo de reacción de 9 hs se detectaron dos productos principales. Basados en los datos obtenidos por el análisis con HPLC-masa y los espectros, se proponen los siguientes productos 2,4-dinitrofenol (para 2- y 4-nitrofenol) y dihidroxidinitrobifenil (sólo 4-nitrofenol). Wang (2006) detectó también el compuesto 2,4-dinitrofenol durante el proceso de degradación del 4-nitrofenol por el hongo de pudrición blanca *P. ostreatus* y propuso que el grupo nitro adicionado al anillo de benceno puede ser liberado durante la degradación del 4-nitrofenol por el hongo. Después de la dimerización, que resultó en la formación de dihidroxidinitrobifenil,

probablemente tuvieron lugar más oxidaciones y polimerización, pero dado que los productos son insolubles, no pudieron ser detectados con RP-HPLC (Kobayashia y Higashimura, 2003).

T. versicolor es capaz de producir una elevada cantidad de enzimas lignolíticas, pero cada una contribuye en diferente medida a la degradación final de la lignina. Entre ellas esta especie produce lacasa, LiP, MnPs y aril alcohol oxidasa, pero probablemente utiliza principalmente MnP y lacasa en la degradación de la lignina (Hatakka, 1994). Ullah y Evans (1999) reportaron que la lacasa purificada de este hongo removió más eficientemente pentaclorofenol que la MnP bajo condiciones *in vitro*. Las lacasas son oxidasas que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos con un grupo funcional fenólico (Hatakka, 1994). La acción clásica de las lacasas, la oxidación de sustratos mediante la transferencia de electrones al anillo de oxígeno, resulta en la formación de quinonas (Majcherczyk et al., 1998) o en la polimerización de fenol o sustratos fenólicos *in vitro* (Thurston, 1994). Sin embargo, en este estudio, los compuestos quinónicos no pudieron ser detectados en el análisis mediante HPLC, sólo precipitaron polímeros y se encontraron extractos de color oscuro en la reacción *in vitro*. Estos resultados nos permiten proponer a la polimerización como vía para la conversión de fenol mediante lacasa de *T. versicolor*. Los resultados obtenidos coincidieron con las conclusiones de Ryan et al. (2007) quienes informaron que el aumento en la concentración de lacasa en muchos casos coincide con la formación de precipitados de color oscuro, que se habrían originado por la polimerización de los inductores fenólicos utilizados para incrementar la producción de esta enzima. Font et al. (1993) sugirieron también una posible polimerización de compuestos de bajo a alto peso molecular en el licor negro degradado por *T. versicolor*.

Se observó también la precipitación de polímeros y no se detectaron quinonas cuando se empleó MnP. La MnP de otro hongo causante de pudrición blanca, *B. adusta*, también fue responsable de catalizar la polimerización de guayacol, *o*-cresol, 2,6-dimetoxifenol y otros compuestos fenólicos y aminas aromáticas (Iwahara et al., 2000).

Los procedimientos que utilizan células inmovilizadas, son más adecuados para los estudios de biodegradación que las células libres en suspensión, ya que la inmovilización permite el uso de las células fúngicas en repetidas ocasiones o incluso continuamente y facilita la separación líquido-sólido. Además, las células inmovilizadas tienden a tener un mayor nivel de actividad y son más resistentes a las perturbaciones ambientales tales como cambios de temperatura o de pH, o la exposición a productos

químicos tóxicos (Rodríguez Couto, 2009). El empleo de células inmovilizadas ha mostrado potencial en varios procesos biológicos tales como el tratamiento de aguas residuales (Rodríguez Couto et al., 2004). En particular, la esponja, como soporte natural, es un material muy útil para la inmovilización de hongos, posee bajo costo y una vez que ya no es útil como un soporte de inmovilización puede ser compostado. *T. versicolor* inmovilizado sobre soportes naturales como el yute, paja y fibras de cáñamo fue aplicado exitosamente a la decoloración de amaranto (Shin et al., 2002). En este trabajo, *T. versicolor* inmovilizado sobre un soporte de tipo esponja preparada a partir de frutos de *L. aegyptiaca* pudo remover fenol, tal como fue descrito previamente y el 97% de 4-nitrofenol 1 mM en 72 hs, además de disminuir la fitotoxicidad de la solución de nitrofenol tratada. Cultivos de hongos de pudrición blanca inmovilizados en reactores de lecho empaquetado removieron fenol y 2,4,6-triclorofenol (concentraciones: 800 y 85 mg l⁻¹, respectivamente) en porcentajes mayores al 98% en ciclos batch de 24-30 hs (Ehlers y Rose, 2005). Recientemente, Aranda et al. (2006) demostraron que mediante el tratamiento de residuos sólidos de olivo con lacasa de los hongos causantes de pudrición blanca se redujo notablemente la fitotoxicidad causada por los compuestos fenólicos de este residuo.

5 Conclusiones

Este estudio muestra la habilidad de cultivos libres en suspensión o inmovilizados de *T. versicolor* BAFC 2234 para degradar fenol y nitrofenol. Esta cepa además disminuyó la fitotoxicidad de las respectivas muestras tratadas. Produjo lacasa como principal enzima lignolítica junto menores títulos de MnP y VP en los medios con fenol y nitrofenol respectivamente. Lacasa y MnP purificadas resultaron eficaces en la remoción del fenol, mientras que MnP y VP fueron las responsables de la remoción del nitrofenol. No se observaron cambios en la capacidad de degradación fúngica cuando un inhibidor de la citocromo P-450 fue adicionado al medio. La inmovilización en esponja permitió combinar una alta tasa de remoción de ambos contaminantes con la reutilización de la biomasa en varios ciclos. En base a estos resultados, la cepa investigada puede ser una opción eficiente para su aplicación en la detoxificación de efluentes contaminados con compuestos fenólicos.

CAPITULO 5

Ensayos de decoloración

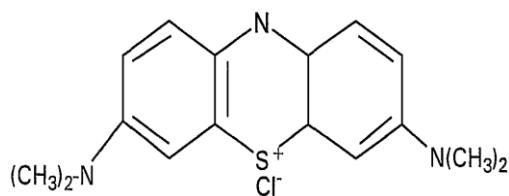
1 Antecedentes

La industria textil vierte al medio ambiente importantes volúmenes de agua residual que crean grandes problemas de polución debido a su alto contenido de tinturas y otros contaminantes. Se estima que de 0.7 millones de toneladas de tinturas que son producidas al año, el 10-20% termina en el agua residual que las industrias eliminan al ambiente (Soares, 2001). Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados en las industrias textiles, papeleras, cosméticas, alimentarias, etc. En comparación con los tintes naturales, tienen mayor variedad de colores, firmeza y moderados costos (Sathiya-Moorthi et al., 2007; Erkurt et al., 2007). Poseen alta estabilidad a la luz, la temperatura, detergentes y al ataque microbiano (Urta et al., 2006; Najafi y Movahed, 2009), lo que dificulta su natural degradación en los sistemas acuáticos. Este es un rasgo deseable desde el punto de vista del consumidor, pero se traduce en una resistencia a la degradación, convirtiéndose así en compuestos recalcitrantes (Vanja et al., 2007). Debido a que la presencia de tinturas en los efluentes se detecta rápidamente y afecta la estética, la transparencia y la solubilidad de los gases en los cuerpos de agua, y especialmente porque muchos colorantes contienen conocidos carcinógenos como bencidina y otros compuestos aromáticos; los efluentes coloreados deben tratarse. Para su tratamiento, suelen utilizarse procesos químicos o físicos (adsorción, precipitación, filtración, intercambio iónico, etc.). Sin embargo estas tecnologías resultan a menudo ineficientes en la remoción del color, caras y poco adaptables a la amplia variedad de tinturas presentes en los efluentes (Fu y Viraraghavan, 2001). Incluso, aún después de un tratamiento convencional (químico o físico) la concentración de algunos de estos colorantes no disminuye y pueden sufrir diferentes reacciones que generan alteraciones en su estructura química y resultan en nuevos componentes xenobióticos que pueden ser más o menos tóxicos que el componente principal (Moeller y Garzón, 2003). Una alternativa ecológica a la descomposición química, es la decoloración y degradación biológica. Varios microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos han sido investigados por su habilidad para degradar colorantes (Azmi et al., 1998). Por su parte los hongos causantes de pudrición blanca, debido al potencial oxidativo de sus enzimas lignolíticas, han demostrado ser organismos adecuados para la decoloración de efluentes coloreados de la industria textil (Pointing 2001); siendo hasta el momento, la clase de microorganismos más eficiente en la descomposición de colorantes sintéticos

(Wesenberg et al., 2003). En consecuencia, la mayoría de los métodos de laboratorio utilizados actualmente para la biodegradación involucran microorganismos aeróbicos como los hongos (Vijayaraghavan et al., 2008). Una ventaja importante de su empleo, es que las enzimas lignolíticas degradan colorantes sintéticos por oxidación, en contraste con la vía de reducción de la degradación bacteriana, que como ha sido demostrado en *P. chrysosporium* no sólo decolora, sino que también detoxifica los efluentes completamente (Asamudo et al., 2005; Gao et al., 2010).

Los mecanismos involucrados en la descomposición de colorantes pueden ser agrupados en tres categorías, bioadsorción, biodegradación y bioacumulación. La bioadsorción es definida como la unión del colorante a la biomasa por un proceso que no involucra energía metabólica o transporte. La biodegradación es un proceso energético-dependiente e involucra la ruptura del colorante en varios productos por la acción enzimática. La bioacumulación es la acumulación de contaminantes por células en activo crecimiento (Papadopoulou et al., 2013). Tales procesos pueden ocurrir simultáneamente si se emplea biomasa viva. Los hongos causantes de pudrición blanca han sido asociados a dos de estos mecanismos, por un lado son capaces de degradar enzimáticamente y por otro de adsorber diferentes colorantes. Las enzimas lacasa, LiP y MnP han sido implicadas en dicho proceso. La naturaleza inespecífica del sistema lignolítico de estos hongos, compuesto principalmente por las tres enzimas recientemente nombradas, presenta una ventaja para la decoloración de efluentes textiles, ya que en las aguas residuales existen generalmente mezclas de colorantes, surfactantes y otros compuestos (Zhao et al., 2007). A su vez, la quitina, que compone las paredes celulares de estos hongos, se ha comprobado que resulta un eficaz bio-adsorbente (Bumpus et al., 1985; Pointing, 2001; Wesenberg et al., 2003). Suspensiones celulares, células inmovilizadas y extractos enzimáticos crudos demostraron ser capaces de degradar diferentes colorantes industriales. Cuando se utilizan preparaciones enzimáticas, una vez que se inactivan las enzimas la decoloración cesa, en cambio utilizando el cultivo entero estas enzimas pueden reponerse constantemente. Los colorantes según su composición química, se pueden clasificar en tres grupos: azoicos, antraquinónicos y derivados del trifenilmetano (Rodríguez-Couto, 2009). Los colorantes antraquinónicos son, por lo general, colorantes de masas moleculares muy altas. Estos compuestos derivan de la antraquinona, producto de la oxidación del antraceno y dan teñidos muy sólidos. Los colorantes antraquinónicos constituyen la segunda clase más importante de los colorantes textiles, después de los azoicos (Dos Santos et al., 2007).

Estos tienen un amplio rango de colores, algunos en el espectro visible, siendo los más comunes el violeta, el azul y el verde (García y Solís Fuentes, 2008). El Azure B, es un colorante antraquinónico y está considerado dentro de los colorantes más recalcitrantes. Es empleado para detectar la presencia de actividad LiP debido a que no puede ser oxidado por las enzimas lacasa o MnP solas (Archibald, 1992; Camarero et al., 2005).



Estructura química del colorante Azure B

Otro efluente industrial muy coloreado es el licor negro. Este es un residuo viscoso de color oscuro generado en el proceso de cocción química Kraft de la madera para la obtención de pulpa de papel. Básicamente está compuesto por licor blanco (solución acuosa con sulfuro de sodio e hidróxido de sodio), lignina y extraíbles de la madera. En el proceso de producción de pulpa de papel, los chips de madera se impregnan con licor blanco y son sometidos a un proceso de cocción (temperaturas de hasta 170°C). A partir de este proceso de cocción, se genera el licor negro, que después de un proceso de concentración, es enviado a la caldera de recuperación, donde adicionalmente a base del vapor generado se produce energía. La pasta obtenida en esta etapa, comienza un proceso de lavado para eliminar el licor negro remanente (tal como se observa en el siguiente esquema resumido) y que de esta forma quede en condiciones para ser blanqueada y/o producir papel (Proceso de producción de celulosa Kraft, <http://www.eis.uva.es/>).



El licor negro contribuye solamente en un 10-15% al total de agua residual, pero representa casi el 80% del color, el 30% de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y 60% de la demanda química de oxígeno (DQO) de la carga total de contaminación de los efluentes provenientes de la producción de pulpa y papel (Rangan, 1987). Durante los últimos 20 años, la contaminación causada por el licor negro ha aumentado seriamente (Pokhrel y Viraraghavan, 2004). La lignina y sus derivados son los principales elementos que contribuyen al color y la toxicidad de este efluente (Da Re y Papinutti, 2011; Font et al., 2003; Lara et al., 2003). La biodegradabilidad anaerobia de este licor negro es baja debido a la presencia de lignina y sus derivados. Los componentes de la lignina son sustancias poliméricas con una compleja estructura y en consecuencia difíciles de degradar. Los hongos causantes de pudrición blanca tienen la habilidad de degradar este polímero, debido a sus enzimas lignolíticas y por ello pueden aplicarse a la decoloración del licor negro (Da Re y Papinutti, 2011).

Desde finales de los años 70, varios estudios han demostrado que los efluentes de la industria de la pulpa y el papel pueden ser decolorados por cultivos de estos hongos (Font et al 2003).

El licor negro es un contaminante de importancia, en consecuencia debe ser tratado previo a su descarga (Shimizu et al., 2010).

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la capacidad de cultivos inmovilizados en esponja vegetal de *T. versicolor* BAFC 2234 para decolorar y reducir la toxicidad del licor negro del pulpado Kraft de madera, a escala de Erlenmeyers. Asimismo se evaluó la capacidad de *T. versicolor* inmovilizado en matriz de alginato y esponja vegetal, para decolorar el tinte heterocíclico Azure B.

Objetivos:

-Evaluar la capacidad de *T. versicolor* (BAFC 2234) de crecer y decolorar el licor negro en medio agar-malta y su capacidad de decoloración por cultivos inmovilizados en *L. aegyptiaca* (esponja vegetal).

-Evaluar la capacidad de esta cepa de decolorar el Azure B en cultivos en placa e inmovilizados en matriz de alginato y esponja vegetal.

2 Materiales y métodos

2.1 Decoloración del licor negro

Se evaluó la capacidad de *T. versicolor* de decolorar el licor negro obtenido a partir la cocción alcalina de chips de madera (cocción Kraft) en placa. Los ensayos de decoloración del licor negro se realizaron en medio sólido en placa en medio agar-malta (agar 2%, extracto de malta 1.2% y glucosa 1%) suplementado con tres concentraciones de licor negro: 1%, 2% y 4% (v/v). El pH fue ajustado a 4.5 por adición de H₂SO₄. La eficiencia degradativa se determinó midiendo los halos de crecimiento y decoloración por un periodo de 31 días, siguiendo la metodología empleada en el capítulo 1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado sobre placas de Petri de 9 mm de diámetro. Para evaluar la decoloración en medio líquido, *T. versicolor* fue inmovilizado en el soporte de esponja vegetal (*L. aegyptiaca*) en medio agar-malta. El cultivo se llevó a cabo en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 30 ml de medio y 2 piezas de esponja (1 x 1 cm). Los cultivos fueron incubados en condiciones estáticas a 28°C por 15 días. Cultivos inactivados mediante autoclavado sirvieron de controles para determinar la pérdida por absorción en el micelio y la matriz de esponja. Los hongos inmovilizados fueron resuspendidos en una solución de licor negro 2% (v/v). A fin de evaluar el porcentaje de decoloración del contaminante se tomaron muestras en forma estéril (1 ml) cada dos o tres días por un periodo de 8 días. Los extractos líquidos se escanearon con espectrofotómetro UV-visible y el área de cada espectro se cuantificó con el programa Image J. La decoloración se expresó como el porcentaje de reducción en el área de absorbancia del licor negro tratado con el hongo, con respecto al control sin tratamiento.



Fig. 1: Licor negro sin tratar (derecha) y solución 2% de licor negro tratado con *T. versicolor* inmovilizado en *L. aegyptiaca* (izquierda).

2.2 Decoloración del colorante Azure B

Se evaluó la capacidad de *T. versicolor* de decolorar el colorante Azure B en placa. El medio consistió en agar-malta al que se le agregó colorante Azure B 25 mM. El hongo fue sembrado en el medio, siguiendo la metodología descrita en el capítulo 1, y se evaluaron cada dos o tres días el diámetro de crecimiento y el halo de decoloración, tal como fue descrito en el primer capítulo de este trabajo. Se midieron actividades enzimáticas lignolíticas en medio sólido al día 15 de incubación siguiendo la metodología descrita para lacasa en el capítulo 1 (en este caso también se determinó MnP). Posteriormente se evaluó la remoción de Azure B con *T. versicolor* inmovilizado en las matrices de alginato y esponja natural *L. aegyptiaca*. El hongo encapsulado en alginato por un lado y en esponja vegetal por el otro (de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 3) fueron trasladados a una solución de Azure B 25 mM. Se evaluó la decoloración por un periodo de 15 días con espectrofotómetro monitoreando la absorbancia a 650 nm. Los espectros de decoloración fueron comparados con los de la solución sin decolorar y se cuantificó el porcentaje de remoción del colorante por comparación de las áreas bajo la curva. Como control se empleó al hongo inactivado mediante calor (autoclavado) para determinar la remoción de colorante por absorción. Los resultados se informan como la media del porcentaje de decoloración de las tres réplicas ensayadas.

3 Resultados

3.1 Decoloración de licor negro

Se evaluó la capacidad de *T. versicolor* de decolorar licor negro en placa y en medio líquido. *T. versicolor* (Fig. 2) creció en las 3 concentraciones de licor negro ensayadas pero sólo fue capaz de decolorar el mismo en la menor concentración (1%). Velocidad de decoloración (9 mm día⁻¹).



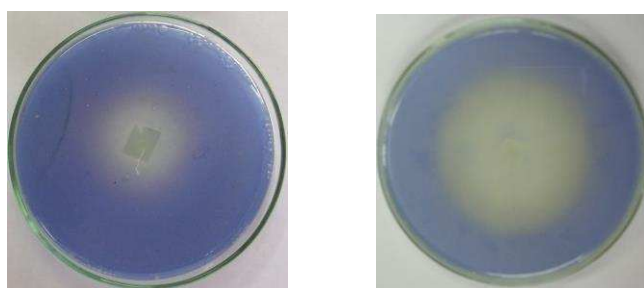
Fig. 2: Decoloración de licor negro en placa por *T. versicolor*

Por otra parte, en medio líquido la cepa inmovilizada en *L. aegyptiaca* fue capaz de decolorar el 59% del licor negro luego de 8 días.

3.2 Decoloración del colorante heterocíclico Azure B

En los ensayos realizados con *T. versicolor* en medio de cultivo sólido suplementado con Azure B (25 mM) se observó que éste resultó capaz de crecer y decolorar el colorante (velocidad de crecimiento: 18 mm día⁻¹, velocidad de decoloración: 12.9 mm día⁻¹). Se midieron las actividades de las enzimas lignolíticas lacasa y MnP luego de 15 días de cultivo. Los mayores títulos correspondieron a la actividad lacasa (0.54 U ml⁻¹), acompañados de bajos registros de MnP (0.03 U ml⁻¹).

En las siguientes figuras se muestra la decoloración del Azure B luego de 7 (derecha) y 15 días (izquierda).



La decoloración con el hongo inmovilizado en esponja vegetal (Fig. 3) también mostró resultados satisfactorios tal como se describe en la Tabla 1. Las actividades lacasa y MnP luego de 15 días medidas en la solución de colorante fueron respectivamente 0.060 y 0.034 U.ml⁻¹. En cuanto al ensayo con *T. versicolor* inmovilizado en la matriz de

alginato (Fig. 4), la remoción del colorante fue menor que en el ensayo anterior (Tabla 1). Atribuyéndose un 60% de la remoción a degradación y un 40% a adsorción.

Tabla 1: Decoloración de Azure B por *T. versicolor* inmobilizado en esponja vegetal y alginato luego de 15 días de evaluación.

Remoción de Azure B (%)	Esponja	
	vegetal	Alginato
Decoloración	91.26	48.0
Adsorción	13.17	19.6
Degradación	78.09	28.4

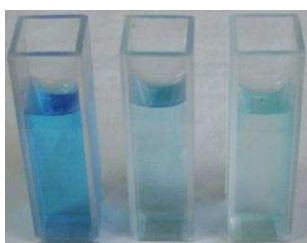


Fig. 3: Decoloración de Azure B por *T. versicolor* inmobilizado en esponja vegetal al inicio del tratamiento (izquierda), a los 7 días (medio) y 12 días (derecha) de evaluación.



Fig. 4: Decoloración por *T. versicolor* inmobilizado en alginato.

4 Discusión

T. versicolor es una cepa que ha mostrado en numerosos ensayos, algunos de ellos desarrollados en este trabajo, gran eficiencia en la remoción de contaminantes. Es así que los resultados obtenidos en el presente capítulo no son la excepción. En este caso el hongo logró decolorar los dos contaminantes evaluados, el licor negro y el colorante heterocíclico Azure B.

La utilización de microorganismos para la solución de problemas medioambientales es una alternativa de creciente expansión con claras aplicaciones industriales.

Se ha comprobado que el tratamiento de efluentes con hongos ligninolíticos no sólo produce decoloración sino también detoxificación (Wesenberg et al., 2003). En el caso del licor negro en estudio, si no se lo incinera en unidades de recuperación, se

transforma en un efluente significativo. El impacto ambiental del licor negro resulta no sólo de su naturaleza química, sino de su color oscuro que reduce la disponibilidad de oxígeno y afecta a la fauna y flora acuática (Jones, 1973). *T. versicolor* BAFC 2234 fue empleado para decolorar el licor negro. El hongo pudo decolorar el licor negro en los cultivos en medio líquido en una concentración de 2% y en placa con una concentración del 1%. En un ensayo similar llevado a cabo con *P. sordida*, *P. sanguineus*, y *T. elegans*, se observaron resultados similares, las tres cepas exhibieron halos de decoloración considerables en medio con extracto de malta (Da Re y Papinutti, 2011). Durante los ensayos de decoloración se detectaron las actividades lignolíticas de las enzimas lacasa y MnP, hallándose al final del periodo de incubación, precipitados oscuros. Esto nos lleva a asociar la remoción del licor negro con la polimerización del mismo. Budda et al. (2012) evaluando también la decoloración de licor negro, encontraron que durante la remoción de este contaminante, tuvo lugar su polimerización, produciendo la precipitación de la lignina y derivados presentes en el mismo.

En las experiencias anteriores con *T. versicolor* realizadas en este trabajo se observó que la remoción del fenol se realiza a través de la polimerización y precipitación del mismo, este patrón se repite también en este ensayo.

La decoloración del Azure B se debió en parte a su degradación enzimática y en parte a la absorción en el micelio y la matriz de inmovilización. Ambos procesos son útiles, ya que se remueve el colorante del medio dejando la solución tratada libre del mismo (Cripps et al., 1990). Cripps et al. (1990) también observaron que 14% de la decoloración del Azure B por *P. chrysosporium*, se debía a la adsorción al micelio. A su vez estos autores concluyeron que un número de sistemas enzimáticos expresados en la idiofase pueden estar involucrados en la remoción de este colorante, no siendo sólo una única enzima la responsable por la decoloración. El Azure B (colorante heterocíclico) se ubica entre los colorantes más recalcitrantes y se utiliza para detectar actividad LiP porque se consideraba que no podía ser oxidado por la lacasa o MnP solas (Archibald, 1992; Camarero et al., 2005). Varias enzimas lignolíticas pueden haber colaborado en la decoloración del Azure B por los cultivos de *T. versicolor* BAFC 2234. En los ensayos realizados en este trabajo se detectaron actividades enzimáticas lacasa y MnP. En las especies pertenecientes al género *Trametes* las lacasas son las principales enzimas, pero las peroxidases son también secretadas durante la degradación de colorantes (Zouari-Mechichi et al., 2006). Lacasas crudas o purificadas han demostrado su capacidad para

degradar distintos colorantes sin embargo, muchas de estas lacasas necesitan de mediadores químicos (Grassi et al., 2011). En consecuencia, es posible que la MnP u otras peroxidasas cooperen con la lacasa en la decoloración, como fue demostrado en *T. versicolor* para la decoloración del Amaranto (Champagne y Ramsay, 2005). Por otra parte es posible que las peroxidasas jueguen un rol indirecto en el proceso de degradación, comenzando una reacción en cadena que conduce a la degradación de contaminantes por la generación de radicales libres, los que a su vez, pueden atacar moléculas muy recalcitrantes que normalmente no son atacadas directamente por las enzimas (Anastasi et al., 2010). Por otra parte Grassi et al. (2011) encontraron que tanto la lacasa cruda como purificada de *T. trogii* decoloraron eficientemente el Azure B, confirmando el rol de esta enzima en la decoloración de este colorante. En cuanto a la actividad LiP, el método espectrofotométrico de Archibald (1992) emplea la decoloración de Azure B como medida de la actividad de esta enzima. Si bien esta actividad no fue detectada en los medios con el hongo inmovilizado, sí se detectó decoloración en los ensayos en placa. Es posible que la actividad en los medios líquidos haya sido muy reducida como para ser detectada por el método de valoración empleado, o que *T. versicolor* no haya producido actividad LiP en esas condiciones. No descartamos tampoco la acción de otras enzimas no valoradas, como la versátil peroxidasa (VP) detectada en esta cepa de *T. versicolor* en otro medio de cultivo y las peroxidasas decolorantes de tintes (DyPs) también halladas en este trabajo en el secretoma de esta cepa. La eficiencia de las DyPs en la decoloración del Azure B ha sido recientemente comprobada (Liers et al., 2013).

5 Conclusiones

T. versicolor es una cepa con reconocida capacidad degradativa. En el tratamiento del licor negro este hongo inmovilizado en esponja vegetal se presenta como una alternativa eficiente para la decoloración de este efluente y reduciría el impacto ambiental de su vertido en ecosistemas acuáticos. Por su parte puede además remover eficientemente el colorante heterocíclico Azure B, siendo de las dos alternativas ensayadas el soporte de esponja vegetal una alternativa efectiva para el tratamiento de aguas residuales coloreadas.

Conclusiones Finales

Los hongos causantes de pudrición blanca, producen enzimas lignolíticas, inespecíficas y altamente oxidativas, con capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos químicos, siendo muchos de ellos contaminantes ambientales. Esto les otorga un potencial para emplearlos en estudios de biorremediación de efluentes industriales. Los compuestos fenólicos son un grupo de moléculas orgánicas cuyo uso masivo industrial condujo a la contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres, resultando en su clasificación como contaminantes prioritarios. En el presente trabajo se realizó un relevamiento de cepas nativas de hongos de pudrición blanca en búsqueda de microorganismos capaces de ser empleados en la degradación y detoxificación de fenoles y derivados. Como resultado de dicho relevamiento se seleccionó a *T. versicolor* BAFC 2234 por su capacidad para degradar distintos compuestos fenólicos (fenol, ácido gálico, 2,6 dimetoxifenol y guayacol) y por su habilidad para utilizar el fenol como única fuente de carbono. Luego de investigar y determinar las condiciones fisiológicas que maximizaran la producción de enzimas lignolíticas por *T. versicolor*, se seleccionó al medio de cultivo jugo de tomate como el más apropiado para la obtención de las enzimas y escalado del cultivo fúngico. Este medio combinado con el uso de los inductores sulfato de cobre y cloruro de manganeso, estimularon la producción de las enzimas lignolíticas de mayor interés para este trabajo, siendo éstas: lacasa, MnP y VP. Las mismas pudieron purificarse, y luego ser usadas para ensayos de degradación in vitro. La VP no había sido purificada previamente en esta especie.

Luego del escalado, se caracterizó el secretoma de la cepa, que permitió acceder a un catálogo de las proteínas secretadas en el mencionado medio. Se identificó un número considerable de las proteínas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica, entre éstas, hidrolasas, peroxidasas y oxidasas fueron las enzimas más abundantes. Se detectó también por primera vez presencia de peroxidasas decolorantes de tintes en *T. versicolor*. El cultivo de la cepa en distintos medios ha demostrado que el mismo hongo secreta distinta variedad y cantidad de enzimas dependiendo del medio. La diversidad observada de las enzimas lignolíticas secretadas en un producto natural tal como el jugo de tomate, puede fomentar más investigaciones sobre los procesos de degradación por hongos en medios complejos a base de plantas. Se evaluó la capacidad de las enzimas lignolíticas purificadas para degradar fenol y nitrofenol. Se comprobó la capacidad de degradación de fenol con las enzimas purificadas lacasa y MnP,

confirmando el rol clave de las dos enzimas en la degradación de este compuesto químico. Cabe mencionar que la lacasa, es la principal enzima producida por *T. versicolor*. Como tal tiene un papel clave en la remoción de los contaminantes evaluados. A pesar de esto la lacasa sola no convierte el nitrofenol, en la remoción de este contaminante la VP juega un rol preponderante. Estudios de degradación mediante HPLC nos permiten proponer a la polimerización como vía para la conversión de fenol mediante lacasa y MnP de *T. versicolor*. Basados en los datos obtenidos por el análisis con HPLC-masa y los espectros, se proponen los siguientes productos 2,4-dinitrofenol (para 2- y 4-nitrofenol) y dihidroxdinitrobifenil (sólo 4-nitrofenol) producto de la acción de la VP sobre el nitrofenol.

Por otra parte la inmovilización ha resultado un medio eficiente para emplearse en biorremediación de fenol, nitrofenol, Azure B y licor negro. La inmovilización en esponja mostró mayor eficiencia en la tasa de remoción que el sistema de alginato de sodio. *T. versicolor* removió el 71, 62, 74 y 73% del fenol 15 mM adicionado en tres ciclos repetidos en un periodo de 23 días, inmovilizado en esponja vegetal (*L. aegyptiaca*). Además disminuyó la fitotoxicidad de las respectivas muestras tratadas. La inmovilización en esponja permite combinar una alta tasa de remoción de los contaminantes con la reutilización de la biomasa en varios ciclos. En base a estos resultados se concluye que cultivos o enzimas lignolíticas de *T. versicolor* BAFC 2234 inmovilizados en distintos soportes pueden constituir una alternativa promisorio para la biorremediación de efluentes contaminados con diferentes compuestos fenólicos. Resta aún por profundizar entonces en esta línea de investigación por ejemplo evaluando el tratamiento de distintos efluentes industriales ricos en fenoles y el escalado del proceso.

Referencias

- Aidoo KE, Hendry R, Wood BJB. 1982. Solid substrate fermentations. *Adv. Appl. Microbiol.* 28, 201-237.
- Alexieva Z, Yemendzhiev H, Zlateva P. 2010. Cresols utilization by *Trametes versicolor* and substrate interactions in the mixture with phenol. *Biodegradation* 21, 625-635.
- Anastasi A, Spina F, Prigione V, Tigini V, Giansanti P, Varese, GC. 2010. Scale up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. *Bioresource Technol.* 101, 3067-3075.
- Annachhatre AP, Gheewala SH. 1996. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol. Adv.* 14, 35-56.
- Aranda E, Sampedro I, Ocampo JA, García-Romera I. 2006. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 58, 176-179.
- Archibald F. 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 3110-3116.
- Asamudo NU, Daba AS, Ezeronye OU. 2005. Bioremediation of textile effluent using *Phanerochaete chrysosporium*. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 1548-1553.
- Asgher M, Nasir Iqbal HM. 2011. Characterization of a novel manganese peroxidase purified from solid state culture of *Trametes versicolor* IBL-04. *Bioresources.* 6, 4317-4330.
- Atlow SC, Bonadonna-Aparo L, Klibanov AM. 1984. Dephenolization of industrial waste waters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 599-603.
- Azmi W, Sani RK, Banerjee UC. 1998. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 185-191.

- Baarschers WH, Donnelly JG, Heitland HS. 1988. Microbial toxicity of triclopyr and related herbicides. *Toxic. Assess.* 3, 127-136.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215-242.
- Baldrian P, Gabriel J. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 235-240.
- Barr DP, Aust SD. 1994. Mechanism white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28, 78-87.
- Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. 2011. Proteomics methodology applied to the analysis of filamentous fungi - New trends for an impressive diverse group of organisms, In: Prasain JK (Ed), *Tandem mass spectrometry - Applications and principles*, InTech, Rijeka, Croatia, pp. 127-160.
- Berrin JG, Navarro D, Couturier M, Olivé C, Grisel S, Haon M, Taussac S, Lechat C, Courtecuisse R, Favel A, Coutinho P, Lesage-Meessen L. 2012. Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass conversion. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6483-6490.
- Blanquéz P, Sarrá M, Vicent T. 2008. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. *Process Biochem.* 43, 1-7.
- Bollag JM, Shuttleworth KL, Anderson DH. 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3086-3091.
- Bonnarme P, Jeffries TW. 1990. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210-217.

- Bordjiba O, Steiman R, Kadri M, Semadi A, Guiraud P. 2001. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 30, 418-426.
- Bourbonnais R, Paice MG. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.
- Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1876-1880.
- Bucke C. 1998. Biochemistry of bioremediation of fungi. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 71, 356-357.
- Budda W, Sarnthima R, Khammuang S, Milintawisamai N, Naknil S. 2012. Ligninolytic enzymes of *Lentinus polychrous* grown on solid substrates and its application in black liquor treatment. *J. Biol. Sci.* 12, 25-33.
- Bumpus J, Tien M, Wright D, Aust S. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228, 1434-1436.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274, 10324-10330.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez A. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1775-1784.
- Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 751-758.

Carabajal M, Ullrich R, Levin L, Kluge M, Hofrichter M. 2012. Degradation of phenol and p-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*. Proceedings of the 5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation. Prague, pp. 69-72.

Chakroun H, Bouaziz M, Dhouib A, Sayadi S. 2012. Enzymatic oxidative transformation of phenols by *Trametes trogii* laccases. *Environ. Technol.* 33, 1977-1985.

Champagne PP, Ramsay JA. 2005. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 276-285.

Cook KA, Cain RB. 1974. Regulation of aromatic metabolism in the fungi: metabolic control of the 3-oxoadipate pathway in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 85, 37-50.

Coradin T, Nassif N, Livage J. 2003. Silica-alginate composites for microencapsulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 429-434.

Covino S, Cvancarova M, Muzikár M, Svobodová K, D'Annibale A, Petruccioli M, Federici F, Kresinová Z, Cajthaml T. 2010. An efficient PAH-degrading *Lentinus* [*Panus*] *tigrinus* strain: Effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices. *J. Hazard. Mater.* 183, 669-676.

Cripps C, Bumpus J, Aust S. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1114-1118.

Cullen D, Kersten PJ. 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In: Brambl R, Marzluf GA (Eds.), *The Mycota III; Biochemistry and molecular biology*, 2nd edn. Berlin-Heidelberg. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 249-273.

Da Re V, Papinutti L. 2011. Black liquor decolorization by selected white-rot fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165, 406-415.

- Dávila G, Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, 30.
- Datta SL, Christena LR, Sriramulu Rajaram YR. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnology* 3, 1-9.
- Dodson PJ, Evans CS, Harvey PJ, Palmer JM. 1987. Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyzes C α -C β cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiol. Lett.* 42, 17-22.
- Dos Santos AB, Cervantes FJ, Van Lier JB. 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technol.* 98, 2369-2374.
- Duran R, Deschler C, Precigou S, Goulas P. 2002. Degradation of chlorophenols by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of 3,4-dichlorophenol on extracellular peroxidase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 284-288.
- Ehlers GA, Rose PD. 2005. Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. *Bioresource Technol.* 96, 1264-1275.
- Ehrhardt HM, Rehm HJ. 1985. Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 32-36.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Khardziani T, Agathos SN. 2010. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1091-1096.
- Enroth C, Neujahr H, Schneider G, Lindqvist Y. 1998. The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. *Structure* 15: 605-617.

Erkurt EA, Unyayar A, Kumbur H. 2007. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochem.* 42, 1429-1435.

Fantroussi SE, Agathos SN. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268-275.

Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martinez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Gorecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kües U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Dueñas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336, 1715-1719.

Font X, Caminal G, Gabarrell X, Romero S, Vicent M. 2003. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 548-554.

Freitag M, Morrell JJ. 1992. Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. *Can. J. Microbiol.* 38, 811-822.

Fu Y, Viraraghavan T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technol.* 79, 251-262.

Gaal A, Neujahr HY. 1979. Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. *J. Bacteriol.* 137, 13-21.

Gao D, Du L, Yang J, Wu WM, Liang H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 70-77.

García BE, Solís Fuentes JA. 2008. ¿Contaminando con sus jeans? Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad Veracruzana. Volumen XII N°1.

García IG, Peña PRJ, Venceslada JLB, Martín AM, Santos MAM, Gómez ER. 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.* 35, 751-758.

Garzillo AMV, Colao MC, Caruso C, Caporale C, Celletti D, Buonocore V. 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 545-551.

Gianazza E. 1995. Isoelectric focusing as a tool for the investigation of posttranslational processing and chemical modifications of proteins. *J. Chromatogr.* 705, 67-87.

Glenn JK, Gold MH. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 329-341.

Godjevargova T, Ivanova D, Alexieva Z, Dimov N. 2003. Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste waters by free and immobilized *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem.* 38, 915-920.

Grassi E, Scodeller P, Filiel N, Carballo R, Levin L. 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *Int. Biodet. Biodegr.* 65, 635-643.

Grey R, Höfer C, Schlosser D. 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J. Basic. Microbiol.* 38, 371-382.

- Guillén F, Evans CS. 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2811-2817.
- Ha J, Engler CR, Wild JR. 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresource Technol.* 100, 1138-1142.
- Hammel K, Cullen D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 349-355.
- Hanaki K, Hirunmasuwana S, Matsuo T. 1994. Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. *Water Res.* 28, 877-885.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125-135.
- Hatakka A. 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbuchel A. (Eds), *Biopolymers, vol 1: Lignin, humic substances and coal*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 129-180.
- Hawari J, Halasz A, Beaudet S, Paquet L, Ampleman G, Thiboutot S. 1999. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2977-2986.
- Heinfling A, Martínez M J, Martínez A T, Bergbauer M, Szewzyk U. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2788-2793.
- Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martinez MJ, Bergbauer M, Szewzyk U, Martinez AT. 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428, 141-146.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2379-2383.

Hofrichter M. 2002. Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme. Microb. Technol.* 30, 454-466.

Hofrichter M, Fritsche W. 1996. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank-coal-depolymerizing activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 220-225.

Hofrichter M, Ullrich R 2006. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 276-288.

Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna M, Liers L, Lundell T. 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 871-897.

Iwahara K, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara MM. 2000. Polymerization of guaiacol by lignin-degrading manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* in aqueous organic solvents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 104-111.

Jack TR, Zajic JE. 1977. The immobilization of whole cells. *Adv. Biochem. Eng.* 5, 125-145.

Ji X-L, Zhang W-T, Gai Y-P, Lu B-Y, Yuan C-Z, Liu Q-X, Mu Z-M. 2012. Patterns of lignocellulose degradation and secretome analysis of *Trametes trogii* MT. *Int. Biodeter. Biodegr.* 75, 55-62.

Johannes C, Majcherczyk A. 2000. Laccase activity test and laccase inhibitor. *J. Biotechnol.* 78, 193-199.

Johannes C, Majchercyk A, Huttermann A. 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediators compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 313-317.

Johansson T, Nyman PO. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 49-56.

Johansson T, Welinder KG, Nyman PO. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 57-62.

Jones HR. 1973. *Pollution Control and Chemical Recovery in the Pulp and Paper Industry*. Noyes Data Corp., New Jersey.

Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ. 1993. Metabolism of p-cresol by the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1125-1130.

Jönsson L, Saloheimo M, Penttilä M. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* 32, 425-430.

Junter GA, Jouenne T. 2004. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. *Biotechnol. Adv.* 22, 633-658.

Kersten PJ, Kirk TK. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169, 2195-2201.

Khachik F, Beecher GR, Smith JC. 1995. Lutein, Lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J. Cell. Biochem.* 22, 236-246.

Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends. Biotechnol.* 25, 395-400.

Kim SJ, Shoda M. 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1029-1035.

Kim Y, Yeo S, Kum J, Song H, Choi H. 2005. Cloning of a manganese peroxidase cDNA gene repressed by manganese in *Trametes versicolor*. *J. Microbiol.* 43, 569-571.

Kirk TK, Farrell R L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.

Kirk TK, Croan S, Tien M, Murtagh E, Farrell RL. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of mutant strain. *Enzyme. Microb. Technol.* 8, 27-32.

Kobayashia S, Higashimura H. 2003. Oxidative polymerization of phenols revisited. *Prog. Polym. Sci.* 28, 1015-1048.

Kokol V, Doliška A, Eichlerová I, Baldrian P, Nerud F. 2007. Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinosa* and by purified laccase and Mn-peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1673-1677.

Kulp WL. 1927. Scientific apparatus and laboratory methods an agar medium for plating *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. *Science* 25, 512-513.

Kusters-van Someren M, Kishi K, Lundel T, Gold MH. 1995. The manganese binding site of manganese peroxidase: characterization of an Asp 179Asn site-directed mutant protein. *Biochemistry* 34, 10620-10627.

Lara M, Rodríguez-Malaver A, Rojas O, Holmquist O, González A, Bullón J, Peñaloza, N, Araujo E. 2003. Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. *Int. Biodet. Biodegr.* 52, 167-173.

Lee CM, Lu CJ, Chuang MS. 1994. Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols. *Wat. Sci. Technol.* 30: 87-90.

Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Cho NS, Hofrichter M, Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27, 175-185.

Levin L, Forchiassin F. 2001. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnol.* 21, 179-186.

Levin L, Papinutti L, Forchiassin F. 1994. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technol.* 94, 169-176.

Liers C, Ullrich R, Pecyna M, Schlosser D, Hofrichter M. 2007. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 785-793.

Liers C, Bobeth C, Pecyna M, Ullrich R, Hofrichter M. 2010. DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1869-1879.

Liers C, Pecyna M, Kellner H, Worrlich A, Zorn H, Steffen KT, Hofrichter M, Ullrich R. 2013. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5839-5849.

Lisov A, Leontievsky A, Golovleva L. 2007. Hybrid Mn peroxidases from basidiomycetes. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 536-543.

Lladó S, Covino S, Solanasa AM, Viñas M, Petruccioli M, D'annibale A. 2013. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *J. Hazard. Mater.* 248, 407-414.

Lundell TK, Mäkelä MR, Hildén K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes-ecological, functional and phylogenetic review. *J. Basic Microbiol.* 50, 5-20.

Magan N, Fragoeiro S, Bastos C. 2010. Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobiology* 38, 238-248.

Majcherczyk A, Johannes C, Huttermann A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 335-341.

Manohar S, Kim CK, Karegoudar TB. 2001. Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 311-316.

Mathialagan T, Viraraghavan T. 2009. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresource Technol.* 100, 549-558.

Marco-Urrea E, Perez-Trujillo M, Caminal G, Vicent, T. 2009. Dechlorination of 1,2,3 and 1,2,4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *J. Hazard Mater.* 166, 1141-1147.

Martínez AT. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 425-444.

Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8, 195-204.

Martínez-Trujillo MA, García-Rivero M. 2012. Revisión: aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 11, 55-73.

Marvin-Sikkema F D, de Bont JAM. 1994. Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 499-507.

Mishra S, Jyot J, Kuhad R, Lal B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1675-1681.

Moeller G E, Garzón M A. 2003. Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. *Anuario IMTA*, pp 77-85.

Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2000. Manganese peroxidase production by *Bjerkandera* sp. BOS55. 1. Regulation of enzymatic production. *Bioproc. Biosystems Eng.* 23, 657-661.

Morgenstern I, Klopman S, Hibbett D. 2008. Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the agaricomycetes. *J. Mol. Evol.* 66, 243-257.

Nair CI, Jayachandran K, Shashidhar S. 2008. Biodegradation of phenol. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 4951-4958.

Najafi H, Movahed HR. 2009. Improvement of COD and TOC reactive dyes in textile wastewater by coagulation chemical material. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 3053-3059.

Neujahr HY, Gaal A. 1973. Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 35, 386-400.

Neujahr HY, Kjellén KG. 1978. Phenol hydroxylase from yeast. Reaction with phenol derivatives. *J. Biol. Chem.* 253, 8835-8341.

Nilsson T, Daniel G, Kirk TK, Obst JR. 1989. Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes. *Holzforschung* 43, 11-18.

- Nilsson I, Möller A, Mattiasson B, Rubindamayugi MST, Welander U. 2005. Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 94-100.
- Novotný Č, Svobodová K, Erbanová P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Šašek V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1545-1551.
- Ortega-Clemente S, Caffarel-Méndez MT, Ponce-Noyola J, Barrera-Córtes HM, Poggi-Varaldo. 2009. Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants. *Bioresource Technol.* 100, 1885-1894.
- Paice MG, Reid ID, Bourbonnais R, Archibald FS, Jurasek L. 1993. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 260-265.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technol.* 74, 69-80.
- Pando Robles, V y Ferreira Batista, C. 2007. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. Instituto de Biotecnología. Portal de Recursos Educativos Abiertos (REA). <http://www.temoa.info/es/node/22776>
- Papinutti L, Forchiassin F. 2000. Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. *Rev. Argent. Microbiol.* 32, 83-88.
- Papadopoulou K, Kalagona IM, Philippoussis A, Rigas F. 2013. Optimization of fungal decolorization of azo and anthraquinone dyes via Box-Behnken design. *Int. Biodeter. Biodegr.* 77, 31-38
- Paszczynski A, Crawford RL. 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Prog.* 11, 368-379.

Pérez J, Jeffries TW. 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2402-2409.

Pogni R, Baratto MC, Giansanti S, Teutloff C, Verdin J, Valderrama B, Lenzian F, Lubitz W, Vazquez-Duhalt R, Basosi R. 2005. Mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry* 44, 4267-4274.

Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 20-33.

Pointing SB, Parungao MM, Hyde KD. 2003 –Production of wood–decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae. *Mycol. Res.* 107, 231-235.

Pokhrel D, Viraraghavan T. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater: a review. *Sci. Total Environ.* 333, 37-58.

Quintero JC, Feijoo G, Lema JM. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae* 13, 61-67.

Rangan SG. 1987. Pollution abatement in paper industry. In: Indian pulp and paper technical association annual conference, New Delhi, 9-10.

Reddy CA, Mathew Z. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. In: Gadd GM (ed) *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, London, pp 52-78.

Rhee SK, Lee GM, Lee ST. 1996. Influence of a supplementary carbon source on biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 816-822.

Rodríguez Couto, S. 2009. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 227-235.

- Rodríguez Couto S, Sanrom MA, Hofer D, Gubitz GM. 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technol.* 95, 67-72.
- Rohene-Soustrade I, Lung-Escarmant B, Bono JJ, Taris B. 1992. Identification and partial characterization of an extracellular manganese-dependent peroxidase in *Armillaria ostoyae* and *Armillaria mellea*. *Eur. J. For. Path.* 22, 227-236.
- Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Perez-Boada M, Martinez MJ, Martinez AT. 2001. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 116-122.
- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Mate MJ, Romero A, Martínez MJ, Smith AT, Martínez AT. 2008. Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochemistry* 47, 1685-1695.
- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Garcia E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT. 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* 60, 441-452.
- Ryan D, Leukes W, Burton S. 2007. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technol.* 98, 579-587.
- Salvachúa D, Prieto A, Martínez AT, Martínez MJ. 2013. Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Irpex lacteus* and its application in the enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4316-4324.
- Santos V, Linardi R. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents, identification and degradation potential. *Process Biochem.* 39, 1001-1006.
- Sathiya- Moorthi P, Periyar S, Sasikalaveni A, Murugesan K, Kalaichelvan PT. 2007. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 424-429.

Scheibner K, Hofrichter M, Herre A, Michels J, Fritsche W. 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 452-458.

Shimizu E, Velez Rueda J, Zapata P, Villalba L. 2010. Relación entre degradación de colorantes y oxidación de lignina residual causados por *Ganoderma applanatum* y *Pycnoporus sanguineus* en el licor negro kraft. *Rev. Cienc. Tecnol.* Año 12 / N° 12a

Shimokawa T, Shoda M, Sugano Y. 2009. Purification and characterization of two DyP isozymes from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 specifically expressed in an air-membrane surface bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 113-115.

Shin M, Nguyen T, Ramsay J. 2002. Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 218-223.

Smidsrød O, Skjak-Brka G. 1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8, 71-78.

Soares GMB, Costa-Ferreira MC, Amorim MTP. 2001. Decolorization of an anthraquinone-type using a laccase formulation. *Bioresource Technol.* 79, 171-177.

Spain J. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 523-555.

Spain JC, Gibson DT. 1991. Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 812-819.

Sugano Y. 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66, 1387-1403.

Sugano Y, Matsushima Y, Tsuchiya K, Aoki H, Hirai M, Shoda M. 2009. Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Biodegradation* 20, 433-440.

- Teeri TT. 2004. Genome sequence of an omnipotent fungus. *Nature Biotechnol.* 22, 679-680.
- Teramoto H, Tanaka H, Wariishi H. 2004. Degradation of 4-nitrophenol by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 312-317.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140, 19-26.
- Tien M, Kirk TK. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method. Enzymol.* 161, 238-249.
- Tripathi A, Upadhyay RC, Singh S. 2011. Mineralization of mono-nitrophenols by *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus* and their extracellular ligninolytic enzymes. *J. Basic Microbiol.* 51, 635-649.
- Udayasoorian C, Prabu PC. 2005. Biodegradation of phenols by ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. *J. Biol. Sci.* 5, 824-827.
- Ullah MA, Evans CS. 1999. Bioremediation of pentachlorophenol pollution by the fungus *Coriolus versicolor*. *Land Contam. Reclam.* 7, 255-260.
- Ullrich R, Hofrichter M. 2007. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 271-293.
- Ullrich R, Huong LM, Hofrichter M. 2004. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl. Microbiol. Biotech.* 67, 357-363.
- Urrea J, Sepúlveda L, Contreras E, Palma C. 2006. Screening of static culture and comparison of batch and continuous culture for the textile dyes biological decolorization by *Phanerochaete chrysosporium*. *Braz. J. Chem. Eng.* 23, 281-290.

- Valli K, Gold MH. 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 173, 345-352.
- Vanja K, Ales D, Ivana E, Petr B, Frantisek N. 2007. Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinsum* and by purified laccase and Mn peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1673-1677.
- Varga JM, Neujahr HY. 1970. Purification and properties of catechol 1,2-oxygenase from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 12, 427-434.
- Vazquez Roncero A, Graciani Constante E, Maestro Duran R. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites* 25, 269-279.
- Venkateswarlu K, Spain JC. 1998. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of p-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl. Environ. Microbiol.* 4, 2479-2484.
- Vijayaraghavan K, Lee MW, Yun YS. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnol. Adv.* 26, 266-293.
- Verschueren K. 1977. *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Villalobos DA, Buchanan ID. 2001. Removal of aqueous phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. *J. Environ. Eng. Sci.* 1, 65-73.
- Wang L. 2006. Studies on the degradation of nitrophenylazophenylamine dyes by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Ph.D dissertation University of Georgia 127 p.
- Wariishi H, Valli K, Gold MH. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelator. *J. Biol. Chem.* 267, 23688-23695.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22, 161-187.

Willaert RG, Baron GV. 1996. Introduction. In: Willaert RG, Baron GV, De Backer L (Eds.), *Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, pp. 1-17.

Wu J, Yu H-Q. 2007. Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresource Technol.* 98, 253-259.

Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalbøge H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 834-841.

Yemendzhiev H, Gerginova M, Krastanov A, Stoilova I, Alexieva Z. 2008. Growth of *Trametes versicolor* on phenol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1309-1312.

Yemendzhiev H, Peneva N, Zlateva P, Krastanov A, Alexieva Z. 2011. Growth of *Trametes versicolor* in nitro and hydroxyl phenol derivatives. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 26, 2726-2730.

Zhang Y, Ma Y, Yang F, Zhang Ch. 2009. Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1117-1121.

Zhang S, Sun W, Xu L, Zheng X, Chu X, Tian J, Wu N, Fan Y. 2012. Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *Pseudomonas* sp. *BMC Microbiol.* 12, 27.

Zhao X, Lu Y, Phillips DR, Hwang H, Hardin IR. 2007. Study of biodegradation products from azo dyes in fungal degradation by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1159, 217-224.

Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 141-148.

Zucconi F, Pera A, Forte M, De Bertoldi M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.

Zybailov B, Mosley AL, Sardu MA, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. 2006. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 5, 2339-2347.