



Actividad enzimática de *Trametes maxima* en cocultivo con micromicetos de suelo en agua sintética-agar (ASA) con atrazina como fuente de «C» y «N»

María Fernanda Romo-García | Refugio Rodríguez-Vázquez | María del Carmen Montes-Horcasitas
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Wilberth Chan-Cupul
INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.

Luis G. Torres-Bustillos
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

correo-e: mromog@cinvestav.mx

Resumen

Existen antecedentes de que compuestos xenobióticos, como lo es la atrazina pueden ser mineralizados o removidos mediante métodos biológicos, por ejemplo la degradación enzimática. Sin embargo, la actividad enzimática en condiciones normales no suele ser suficiente para la degradación de estos compuestos xenobióticos, por lo que en el presente trabajo se busca aumentar la producción enzimática de hongos ligninolíticos bajo estrés biótico al confrontarlos con hongos filamentosos conformando un cocultivo, así como caracterizar la influencia que tiene esta condición sobre el crecimiento y la producción de enzimas.

Palabras clave: enzimas ligninolíticas, interacciones, micorremediación, biotecnología verde.

Introducción

En la agricultura convencional, la atrazina es el herbicida más empleado en todo el mundo y en México es el tercero (Hernández-Antonio y Hansen, 2011). Este herbicida es considerado como un disruptor endocrino, al ocasionar anormalidades en el desarrollo reproductivo e inmunosupresión en organismos no blancos (anfibios, reptiles, peces y mamíferos) (U.S. Centers for Disease Control, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003), por esta razón su uso ha sido cuestionado en la agricultura sustentable.

La remoción de atrazina en agua y suelo contaminado ha sido objeto de estudio en los últimos años, la biorremediación a través de la micorremediación, es una estrategia promisoría para la descontaminación de agua y suelo (Barr *et al.*, 1992). La micorremediación consiste en la aplicación de hongos o sus enzimas para la remoción, degradación o transformación del contaminante.

Este proceso es mediado por enzimas extracelulares como las lacasas (EC 1.10.3.2) y manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.14) (Christian *et al.*, 2005). La sobreproducción de estas enzimas a través de métodos compatibles con la biotecnología verde, evitando el uso de inductores químicos y la modificación genética de microorganismo, ha sido foco de estudio científico.

Al respecto, se ha demostrado que el cocultivo de basidiomicetos con micromicetos de suelo, es ventajoso para la producción de lacasa y MnP, comparado al simple monocultivo de basidiomicetos (Chan-Cupul *et al.*, 2014). Sin embargo, en cuanto a la remoción de atrazina en agua contaminada mediante cocultivos fúngicos, aún está en fase de investigación.

Por tanto, para conocer la habilidad de los cocultivos a fin de adaptarse a agua contaminada, la finalidad de este estudio fue: 1) evaluar la compatibilidad de *Trametes maxima* con hongos micromicetos de suelo a través de cocultivos en agua sinté-

tica-agar (ASA), 2) evaluar la actividad lacasa y MnP en los cocultivos estudiados bajo el estrés por atrazina en ASA.

Metodología

Se empleó una cepa nativa de *T. maxima* (basidiomiceto) y *Paecilomyces carneus* aislado e identificado por Chan *et al.* (2014) y Heredia y Arias (2008), respectivamente, el resto de los micromicetos de suelo fueron aislados de suelo rizosférico de *Phragmites australis* colectado en La Macha, Actopan, Veracruz. Los cocultivos se realizaron en cajas Petri con ASA (Glucosa 40 µg/l, KH₂PO₄ 28µ/L, NH₄NO₃ 30µ/l), el cual se elaboró con base en la fórmula para agua sintética de la NOM-DIN 3841M.

La atrazina se adicionó al ASA después de su esterilización cuando tenía entre 30 y 40 °C a una concentración de 30 ppm. Los cocultivos se establecieron inoculando a *T. maxima* (1 disco micelio-agar 6 mm de diámetro) en el lado izquierdo de la caja Petri e inoculando al micromiceto filamentos del lado derecho (5 µl de una solución de 1×10^7 esporas/ml). Como controles se emplearon monocultivos de cada hongo.

Se evaluó el crecimiento radial del hongo empleando una escuadra milimétrica y se evaluó el tipo de interacción de acuerdo con la escala establecida por Badalyan *et al.*, (2004), donde se describen los siguientes tipos de interacción: a) inhibición mutua al contacto, b) inhibición a distancia, c) reemplazo con crecimiento sin inhibición al contacto, C_{A1} reemplazo parcial después de la inhibición al contacto, C_{A2} reemplazo completo después de una inhibición al contacto, C_{B1} reemplazo parcial después de una inhibición a distancia y C_{B2} reemplazo completo después de una inhibición a distancia.

La actividad enzimática se evaluó al momento de la confrontación entre *T. maxima* y el micromiceto (unión de micelios). El extracto enzimático se obtuvo tomando cinco discos de micelio-agar de la zona de confrontación y depositándolo en 5 mL de agua

desionizada estéril, el agua con los discos se agitó durante 15 min y centrifugó a 7 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se tomó para la cuantificación de lacasa y MnP (Qian y Chen, 2012)

Resultados y discusión

Los resultados indican que *T. maxima* es compatible con *Penicillium sp.* No. 2, debido a que mostraron una inhibición al contacto. La cepa de *Trichoderma sp.*, *Paecilomyces carneus* y *Penicillium sp.* No. 1 mostraron inhibición a distancia y *Aspergillus sp.* mostró un remplazo parcial sobre *T. maxima* (cuadro 1). En sí, estas cepas no son compatibles con *T. maxima* (figura 1).

Cuadro 1
Tipo de interacción entre *Trametes maxima*
y diferentes hongos de suelo

	Micromicetos de suelo				
	TRIC	PEN1	PEN2	AS	PAE
<i>T. maxima</i>	B (2)	B (2)	A (1)	C _M (3.5)	B (2)

TRIC = *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* No.1, PEN2 = *Penicillium* No. 2, PAE = *Paecilomyces carneus*.

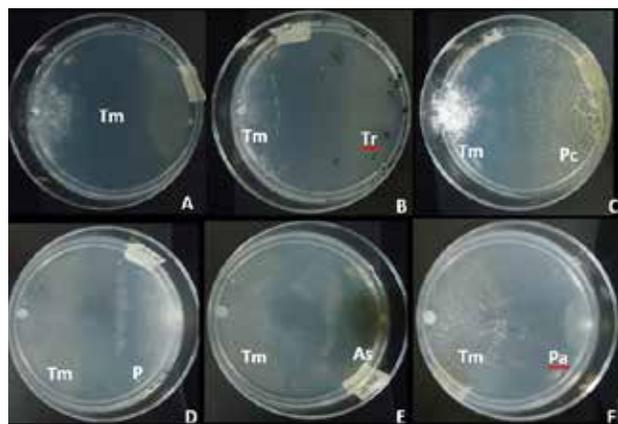


Figura 1. Tipos de interacción entre *Trametes maxima* y hongos de suelo en agua sintética agar (ASA).

En cuanto a la actividad enzimática en ASA, se encontró una mayor actividad de MnP en el cocultivo de *T. maxima-Penicillium sp.* No. 1 (8 U/L, figura 2A), comparado con el monocultivo de *T. maxima*. Sin embargo, cuando a este cocultivo se realizó en ASA suplementado atrazina (30 ppm), la actividad enzimática se inhibió significativamente ($p < 0.05$), este efecto en la actividad enzimática, representa un efecto tóxico sobre ambos hongos. Por el contrario, bajo el efecto de la atrazina, el cocultivo de *T. maxima-P. carneus* estimuló ($p < 0.05$) su actividad MnP.

Existen reportes que mencionan ambos fenómenos en organismos fúngicos, al respecto, se ha reportado un incremento en la actividad MnP de *Ganoderma lucidum* entre 2.0 y 3.3 veces más cuando se dispuso en medio de cultivo con bentazón y diuron (herbicidas) (Da Silva *et al.*, 2010). No obstante, también se ha reportado una fuerte inhibición en la producción de MnP de *C. maxima* y *C. hirsutus* al cultivarlo en un medio suplementado con 20 gm L⁻¹ de atrazina (Gorbatova *et al.*, 2006).

Respecto a la actividad lacasa, *T. maxima* no incrementó la actividad de la enzima cuando se dispuso en cocultivo en medio de ASA sin atrazina. En contraste, cuando se le adicionó atrazina al ASA y se dispuso a *T. maxima* en cocultivo con *Penicillium sp.* No. 1 y *Trichoderma sp.*, se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad lacasa. Los incrementos fueron en el orden de 1.0 y 1.2 veces más con *Penicillium sp.* No. 1 y *Trichoderma sp.*, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de Mougín *et al.* (2002), quienes encontraron un aumento en la actividad lacasa entre 3.6 y 4.0 veces al crecer a *T. versicolor* en medio de cultivo con atrazina (5 mM).

La actividad lacasa en el ASA con atrazina es mayor que cuando no se le agrega atrazina. Posiblemente este efecto sea mediado por la falta de fuentes de C y N en el ASA sin atrazina, o posiblemente el estrés por atrazina sea la razón de este incremento en la actividad enzimática, como lo reportan algunos

estudios (Gorbatova *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2005; Mougin *et al.*, 2002).

Además de la atrazina, otros herbicidas que actúan como estresores e incrementan la actividad lacasa en hongos ligninolíticos se encuentran el Bentazon, Diuron y el Imazaquín Rezende *et al.*, 2005). Los aportes de este trabajo son puntuales en cuanto a la selección de cocultivos con actividad lacasa y MnP bajo estrés por atrazina en ASA.

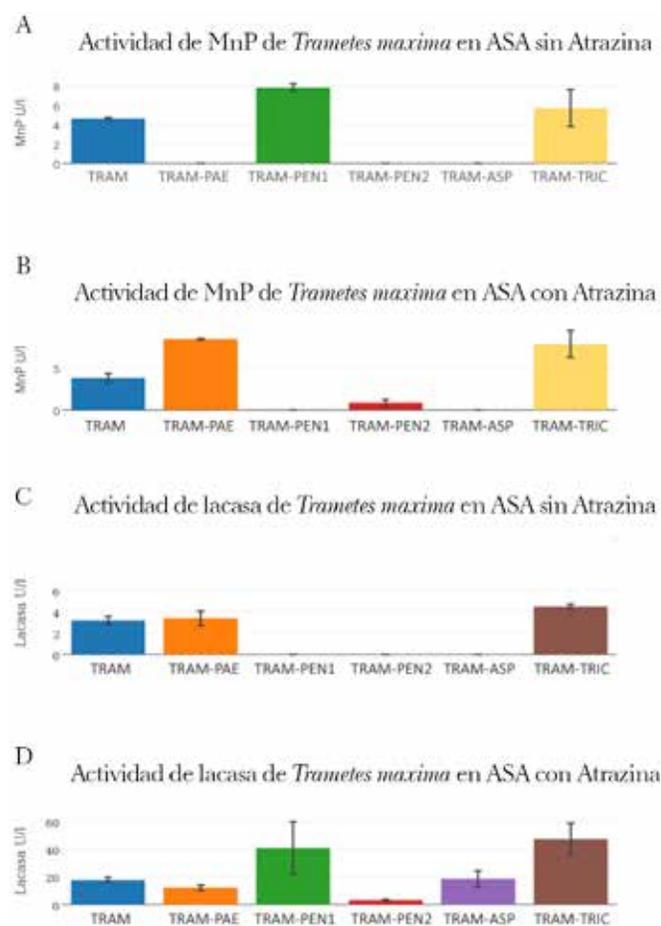


Figura 2. Actividad MnP y lacasa en el cocultivo de *T. maxima* y micromicetos de suelo en ASA con y sin atrazina.

Tomando en consideración lo mencionado, el cocultivo entre *T. maxima* y *Trichoderma sp.*, es candidata a emplear en el estudio de micorremediación de atrazina en agua contaminada, debido a su incremento en la actividad lacasa y MnP.

Conclusiones

La compatibilidad (inhibición al contacto micelial) entre *Trametes maxima* y micromicetos de suelo no se pudo relacionar con la actividad lacasa y MnP en los cocultivos. Sin embargo, ambas enzimas fueron incrementadas por la adición de atrazina en el ASA. Se propone al cocultivo *T. maxima-Trichoderma sp.* como candidato para evaluar en micorremediación de atrazina en agua contaminada.

Agradecimientos

Especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y a la doctora Refugio Rodríguez Vázquez y Wilberth Chan Cupul.

Referencias

- Badalyan, S.M., Innocenti, G., Narine, G. (2004). Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathologia Mediterranea*, 43:44-48.
- Barr, D.P., Shah, M.M., Chung, N., Aust, S.D. (1992). Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals. *Toxicology Letters*, 64-65:493-501.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H.A., Vyas, B.R. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(4): 301-312.
- Da Silva, C., Oliveira, A., Marques, S.C., Bracht, A., Peralta, R.M. (2010). Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzyme by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2):156-161.
- Gorbatova, O.N., Koroleva, O.V., Landesman, E.O., Stepanova, E.V., Zherdev, A.V. (2006). Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(4):468-74.

- Heredia, G., Arias, M.R. (2008). Saprobies and endomycorrhizal fungi in soils. In R.H. Manson, V.O. Hernández, S. Gallina, K. Mehlreter (Eds.), *Coffee agroecosystems of Veracruz: Biodiversity, conservation and management* (pp. 193-213). Veracruz, México: Instituto de Ecología, A.C./Instituto Nacional de Ecología.
- Hernández-Antonio, A., Hansen, A.M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2):115-127.
- Mougin, C., Kollmann, A., Jolival, C. (2002). Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*, 24(2):139-142.
- Qian, L., Chen B. (2012). Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*, 24(9):1639-1646.
- Rezende, M., Barbosa, A.M., Vasconcelos, F.A., Haddad, R., Dekker, R.H. (2005). Growth and production of laccase by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*, 45(6):460-469.
- U.S. Centers for Disease Control Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2003). *200 Toxicological Profile for Atrazine*. Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153.html>