

Evaluación de pruebas bioquímicas para determinar actividad lacasa en hongos utilizados en biorremediación de suelos.

Rodríguez Ruíz, J.M.¹, Pliego Sandoval, J.E.^{2*}, Reyes Nava, L.A.³, Sánchez Cruz, D.N.², ,
Iñiguez Muñoz L.E.³, Cortés Romero, C.⁴.

- ¹Estudiante de la Licenciatura en Agrobiotecnología, Centro Universitario de Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.
²Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.
³Departamento de Ciencias de la Naturaleza, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva 883, Col. Centro, C.P. 49000, Ciudad Guzmán Jalisco, México.
⁴Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421, Col. Olímpica, C.P. 44430 Guadalajara, Jalisco.

*jorge.pliego@cusur.udg.mx

Palabras clave: Contaminación, enzimas, lacasas, clorofenoles.

Introducción

La agricultura es una actividad de mucha importancia no sólo en México sino a nivel mundial, debido a que desempeña un papel crucial en la economía del país, es un gran generador de empleos y es la principal fuente de producción de alimentos para consumo humano (1).

En los últimos años, el sector agrícola mexicano no ha parado de crecer, solo en el 2019 el valor de producción de cultivos represento una inversión de 675 millones de pesos (2). Jalisco es el estado número uno en la producción agrícola aportando 13.6% del volumen de la producción nacional. Del total de la producción agroalimentaria en tierras jaliscienses, el 87,8% corresponde a la producción agrícola (3), para el desarrollo de esta actividad se utilizan diferentes insumos de entre los cuales resaltan los agroquímicos.

Los agroquímicos son sustancias usadas para mejorar la producción de las cosechas; sin embargo el uso indiscriminado de estos compuestos ha provocado una alta contaminación en los suelos agrícolas, causando destrucción de ecosistemas naturales, infertilidad de suelos y pérdida de cultivos (4). Se ha buscado implementar alternativas amigables con el medio ambiente que nos ayuden a degradar los residuos de estos productos presentes en suelos agrícolas. Una alternativa que ha resultado factible es la biorremediación, la cual utiliza la capacidad de los organismos vivos para absorber, degradar o transformar compuestos de gran impacto ambiental.

La biorremediación a su vez se divide en 3 grupos: la fitorremediación, remediación microbiana y degradación enzimática. Esta última resalta debido la importancia de las enzimas como catalizadores biológicos que aceleran la velocidad de una reacción química específica. Los organismos con gran importancia como productores de enzimas son los hongos. Estos son organismos eucariotas que se caracterizan por estar constituidos por estructuras llamadas hifas y su capacidad de crecimiento es notable. A su vez estos organismos tienen un alto potencial en biorremediación de suelos y una alta tolerancia a condiciones de crecimiento (5).

Una de las principales enzimas utilizadas en la biorremediación de contaminantes en suelos agrícolas es la lacasa, cuya principal función es degradar compuestos similares a la lignina y compuestos orgánicos aromáticos tanto fenólicos como no fenólicos de alto impacto ambiental. La amplia variedad de sustratos que pueden ser degradados por estas enzimas las hace útiles para diferentes procesos biotecnológicos

tales como degradación de tintes y la remoción de compuestos fenólicos, xenobióticos, entre otros compuestos aromáticos (6).

Entre estos compuestos se encuentran los clorofenoles, estos son un grupo de compuestos químicos en los que se ha adicionado uno o varios átomos de cloro a la molécula de fenol. En la agricultura son utilizados como biocidas y son considerados unos de los compuestos más peligrosos a nivel mundial (7). Actualmente se utiliza el 2,4,6-triclorofenol como fungicida, herbicida, insecticida, antiséptico y defoliante. Este compuesto se encuentra en la lista de prioridades nacionales identificadas por la Agencia de Protección Ambiental, por clasificarse como posible carcinógeno (8). Otro compuesto clorofenólico aplicado en cultivos agroalimentarios es el ácido 2,4-diclorofenoxiácetico aplicado como herbicida sistémico hormonal auxínico, para control de malezas de hoja ancha.

Entre los estudios relacionados con el tema se encuentra el de Bellot y col. en 2011, quienes mencionan que los hongos basidiomicetos son capaces de transformar y mineralizar compuestos clorofenólicos utilizando enzimas ligninolíticas, entre las que se encuentra la lacasa, lo cual confirma su potencial aplicación en biorremediación. Por otra parte Rodríguez en el 2006, demostró que las enzimas ligninolíticas lacasas y peroxidases producidas por hongos basidiomicetos, están implicadas en la degradación de 2,4-diclorofenol y benzopireno.

Por lo cual la finalidad de este trabajo fue implementar pruebas bioquímicas en placa para determinar lacasas a partir de hongos filamentosos con un posible potencial en aplicaciones del área agroalimentaria.

Metodología

Materiales

Agar Papa Dextrosa (PDA) Bioxon®, cajas petri, ácido 2,2-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS), glucosa, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, agar, extracto de levadura.

Reactivación de cepas

Las cepas utilizadas fueron *Trichoderma sp*, *Penicillium sp*, *Penicillium chrysogenum* y *Fusarium equiseti*. La reactivación se realizó por microgota en cajas petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) Bioxon ® a 30°C durante 5 días.

Determinación cualitativa de actividad lacasa

Se determinó por ensayos de coloración del (ABTS) descrita por Montoya, 2014. El medio se preparó con 10g/L de glucosa, 2g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g/L de ABTS, 22 g/L de agar y 0.2 g/L de extracto de levadura. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 72 horas. Para determinar la actividad enzimática, posteriormente se midió el tamaño del halo color azul/verdoso con una regla milimétrica. Posteriormente se observó al estereoscopio LeicaZoom 200.

Determinación cuantitativa por índice de potencia

Para determinar actividad cuantitativa se determinó la longitud de los halos presentados en el Software ImageJ utilizando la siguiente expresión:

$$I. P = \frac{\text{Área del halo de actividad}}{\text{Área de la colonia}}$$

Resultados y discusión

La actividad lacasa se determinó mediante la presencia de un halo azul-verdoso. Esta coloración se debe a la reacción de oxidación del agente oxidante (ABTS) con el cobre tipo I que contiene la enzima. En figura 1 A,B,C se puede observar cuatro cajas con un control negativo agregando *Penicillium sp*, *Trichoderma sp.* y *Penicillium chrysogenum* en comparación con *Fusarium equiseti*, la cual muestra un halo color azul/verdoso.

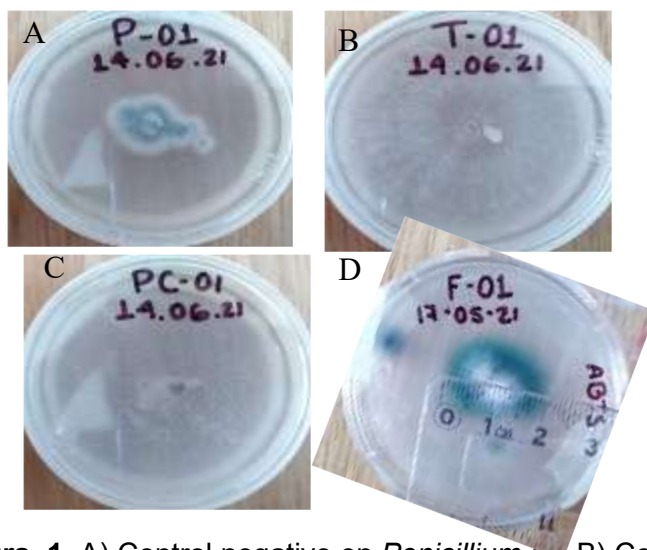


Figura 1. A) Control negativo en *Penicillium sp.* B) Control negativo en *Trichoderma sp.* C) Control negativo en *Penicillium chrysogenum*. D) Control positivo en *Fusarium equiseti*.

Como se muestra en la figura 2 *Fusarium equiseti* muestra una coloración azul producida por la actividad en la caja en presencia de ABTS el cual hace reacción con el cobre tipo I, presente en las lacasas, del mismo modo se pueden observar sus estructuras ramificadas.

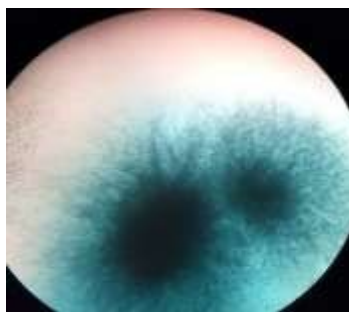


Figura 2. *Fusarium equiseti* visto al estereoscopio LeicaZoom 200.

Posterior a la prueba confirmativa se procedió a medir el halo radial de crecimiento de la cepa y el halo generado por la oxidación del sustrato obteniéndose un área del hongo 0.79 cm^2 un área del halo presentado de 2.54 cm^2 , con un índice de potencia de 3.21

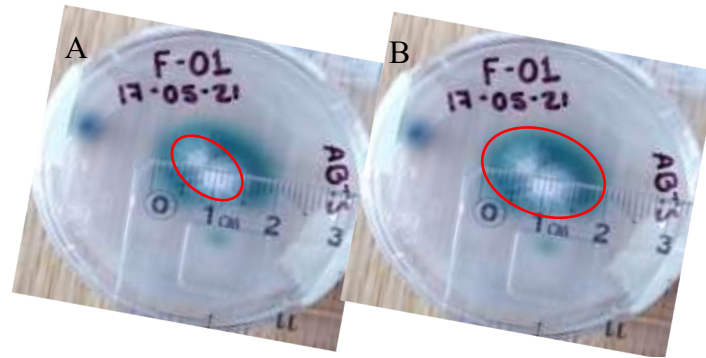


Figura 3. A) Medición del área del crecimiento de la cepa en *F. equiseti*. B) Medición del halo de actividad lacasa presentado en *F. equiseti*.

La cepa *F. equiseti* mostró presencia de actividad lacasa en medio complementado con ABTS. En cuanto a las condiciones del medio utilizada es posible mencionar que son adecuadas para la determinación de lacasas, ya que la coloración presentada en la caja petri se debe a la reacción catalítica de oxidación con el cobre tipo I presente en la reacción asociada a la captura y transferencia de electrones tal como lo describe Montoya en el 2014. Los estudios de Bellot y col. 2011 muestran que las cepas del género *Basidiomicetos* son productoras de lacasas, sin embargo, dado el alcance de este trabajo, aun no es posible generalizar que todas las cepas de *Fusarium* son productoras de lacasas. En una siguiente etapa se pretende implementar las lacasas en la degradación de clorofenoles aplicados a suelos contaminados de la industria agroalimentaria.

Conclusiones

De las cuatro cepas evaluadas, *F. equiseti* fue la que tuvo una prueba positiva de actividad enzimática lacasa en comparación con las otras tres cepas. Basándonos en las pruebas realizadas y los resultados obtenidos podemos concluir que *F. equiseti* produce lacasas las cuales pueden utilizarse en procesos de remoción de contaminantes basados en clorofenoles.

Referencias

1. FAO. México en una mirada, 2021. Disponible en: <http://www.fao.org/mexico/fao-en-mexico/mexico-en-una-mirada/es/>
2. Statista. El sector agrícola en México, 2020. Disponible en: <https://es.statista.com/temas/7029/el-sector-agricola-en-mexico/>
3. SADER. SADER-Jalisco urge a revertir la contaminación por agroquímicos, 2020. Disponible en: <https://sader.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/2997>
4. Izquierdo J. Contaminación de los suelos agrícolas provocados por el uso de los agroquímicos en la parroquia San Joaquín. Universidad Politécnica Salesiana; 2017.
5. Arteaga Á. Producción y caracterización de enzimas celulolíticas obtenidas de microorganismos aislados de materia vegetal. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2013. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/11760/1/1080215607.pdf>
6. Zapata Y. Efecto de la concentración de nitrógeno y agentes inductores sobre la producción de lacasas. Universidad Pontificia Bolivariana; 2013.
7. Bellot I, Mollinedo P, Gemio R, Morales I, Morales M. Degradación de clorofenoles en soluciones sintéticas utilizando hongos H3. Rev Boliv Química. 2011;28, núm 2:102.105. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339676009>
8. Ramos-Ramírez E, Martínez-Gómez C, Tzompantzi-Morales F, Del Ángel-Montes GA, Mendoza-Damián G, Gutiérrez-Ortega NL. Degradación del 2,4,6-triclorofenol usando hidrotalcitas calcinadas

Mg/Al como fotocatalizadores. Superf y Vacío. 2015;28(3):92–8. Disponible en: www.scielo.org.mx/pdf/sv/v28n3/1665-3521-sv-28-03-00092.pdf.