



ORIGINAL

Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca



Reyna L. Camacho-Morales*, José Luis Gerardo-Gerardo, Karina Guillén Navarro y José E. Sánchez

El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México

Recibido el 24 de junio de 2016; aceptado el 30 de noviembre de 2016

Disponible en Internet el 18 de abril de 2017

PALABRAS CLAVE

Biorremediación;
Plaguicidas;
Enzimas
extracelulares;
Paraquat

Resumen El paraquat es un herbicida utilizado ampliamente en la agricultura. Debido a su gran distribución y uso inadecuado, representa un problema grave de contaminación del suelo y el agua. Se ha encontrado que los hongos de la podredumbre blanca son capaces de degradar compuestos contaminantes que poseen estructuras similares a la lignina, como es el caso del paraquat. En el presente trabajo se evaluó la degradación de este herbicida y su efecto en la producción de enzimas ligninolíticas por parte de algunos hongos de la podredumbre blanca aislados del sur de México. Seis cepas fúngicas mostraron tolerancia al herbicida durante el cultivo en medio sólido. Tres de las 6 cepas evaluadas, correspondientes a las especies *Polyporus tricholoma*, *Cilindrobasidium laeve* y *Deconica citrispora*, mostraron niveles de degradación del 32, el 26 y el 47%, en ese orden, a los 12 días de cultivo en presencia del xenobiótico. Se detectó un incremento en las actividades de las enzimas lacasa y Mn-peroxidasa en las cepas que presentaron el mayor porcentaje de degradación, probablemente asociado a la disminución del herbicida. Adicionalmente, se realizaron ensayos con extractos enzimáticos procedentes del medio de cultivo extracelular de las 2 cepas que presentaron mayor degradación. Después de 24 h de incubación, se obtuvo una degradación del 49% del paraquat inicial con los extractos de *D. citrispora*. Los resultados obtenidos indican que la degradación del herbicida estaría asociada a la presencia de enzimas extracelulares en los hongos de la podredumbre blanca. En este trabajo se muestran las primeras evidencias del potencial de biodegradación de diferentes especies de hongos de la pudrición blanca.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rcamacho@ecosur.mx (R.L. Camacho-Morales).

KEYWORDS

Bioremediation;
Pesticides;
Extracellular
enzymes;
Paraquat

Ligninolytic enzyme production by white rot fungi during paraquat (herbicide) degradation

Abstract Paraquat is a widely used herbicide in agriculture. Its inappropriate use and wide distribution represents a serious pollution problem for soil and water. White rot fungi are capable of degrading pollutants having a similar structure to that of lignin, such as paraquat. This study evaluated the degradation effect of paraquat on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi isolated from the South of Mexico. Six fungal strains showed tolerance to the herbicide in solid culture. Three of the six evaluated strains showed levels of degradation of 32, 26 and 47% (*Polyporus tricholoma*, *Cilindrobasidium laeve* and *Deconica citrispora*, respectively) after twelve days of cultivation in the presence of the xenobiotic. An increase in laccase and manganese peroxidase (MnP) activities was detected in the strains showing the highest percentage of degradation. Experiments were done with enzyme extracts from the extracellular medium with the two strains showing more degradation potential and enzyme production. After 24 hours of incubation, a degradation of 49% of the initial paraquat concentration was observed for *D. citrispora*. These results suggest that paraquat degradation can be attributed to the presence of extracellular enzymes from white rot fungi. In this work the first evidence of the biodegradation potential of *D. citrispora* and *Cilindrobasidium laeve* is shown.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Las prácticas agrícolas son una de las principales actividades responsables de la liberación de sustancias contaminantes al ambiente¹⁵, dentro de ellas, los herbicidas son los plaguicidas más utilizados⁴⁰. El paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida no selectivo y no sistémico que actúa sobre el fotosistema I, específicamente en el cloroplasto. Primero ocasiona la formación de radicales libres y, posteriormente, reacciona con el oxígeno y produce radicales superóxido, los cuales fragilizan y desintegran los tejidos y las membranas de las células⁴⁷. El paraquat se utiliza para el control de la maleza en la producción de café, cacao, coco, aceite de palma, caucho, banano, papaya, mango, maíz y caña de azúcar, entre otros.

El paraquat es altamente persistente y se inactiva por completo al entrar en contacto con el suelo, por lo que se almacena en este. Se ha comprobado que en suelos turbosos anaerobios, el tiempo de desintegración media (TD₅₀) puede alcanzar hasta 7,2 años; en suelos aerobios, 1,2 años, y en suelos arenosos aerobios, 2,6 años. Este herbicida es nocivo para todos los seres vivos; en humanos se absorbe por contacto y ocasiona lesiones en los tejidos expuestos, como resequedad y fisuras. Una exposición prolongada puede causar incluso ampollas y ulceraciones en la piel. También puede entrar al organismo por vía digestiva e inhalación y originar congestión, edema en los pulmones y, en ocasiones, la muerte³⁷.

Un método ecológico y viable de biorremediación de este tipo de compuestos es el uso de macromicetos, el cual aprovecha la capacidad metabólica de estos agentes para transformar o mineralizar contaminantes orgánicos y compuestos recalcitrantes en sustancias menos peligrosas^{4,30}.

Los hongos de la podredumbre blanca (HPB) han sido los más estudiados⁶, ya que son reconocidos por su capacidad

para metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos persistentes^{1,2,13,19,21,24,28,35,39,44,46} y por demostrar una elevada capacidad degradativa, debido a que toleran altas concentraciones de contaminantes^{11,33}.

Los HBP han desarrollado un sistema enzimático extracelular único y no específico, que permite la degradación total de los componentes químicos y estructurales de la madera. Tienen la capacidad de sintetizar enzimas como la lacasa, la manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa (LiP)^{8,12}. Otras enzimas implicadas en este proceso son las del tipo oxidativas, como la aril alcohol oxidasa y la glioxal oxidasa, que generan H₂O₂^{5,26}.

Estos hongos han sido efectivos en la degradación de contaminantes ambientales peligrosos. Por ejemplo, *Trametes versicolor* degradó en 36 h de incubación el 46 y el 65% de fenantreno (100 mg/l) en cultivo agitado o estático, respectivamente¹⁴. *Trametes maxima* y *Ganoderma zonatum* fueron capaces de degradar el 99 y el 73% de DDT, respectivamente⁷, y un extracto crudo de enzimas de *Pleurotus djamor* degradó el 90,39% del tinte Direct Blue 14 en 6 h de incubación⁴¹.

Otros métodos que se utilizan para la remoción de contaminantes son los tratamientos químicos, en los cuales se utilizan agentes oxidantes como el ozono (O₃) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la radiación UV, el reactivo de Fenton y el sistema foto-Fenton^{3,17,27,34}. Sin embargo, los elevados costos, la baja eficiencia y la generación de nuevos compuestos contaminantes hacen que estas técnicas sean alternativas poco útiles en términos prácticos.

La degradación del paraquat por organismos ha sido poco estudiada, el único reporte en la literatura para la remoción de este compuesto menciona el uso de la bacteria *Pseudomonas putida*, con un 47,29% de degradación y de hasta un 95% en presencia de carbón activado²³.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de 6 especies de hongos de la pudrición blanca para degradar el herbicida paraquat y analizar la influencia de este compuesto en la producción de enzimas ligninolíticas por parte de estos hongos.

Materiales y métodos

Material biológico

Se emplearon 8 cepas de HPB depositadas en la colección micológica de ECOSUR (Tapachula, Chiapas, México): *Polyporus tricholoma* (ECS-58), *Phellinus gilvus* (ECS-61), *P. tricholoma* (ECS-64), *Deconica citrispora* (ECS-77), *Gymnopus barbipes* (ECS-85), *Cyathus olla* (ECS-86), *Cylindrobasidium laeve* (ECS-91) y *Grifola frondosa* (ECS-703). Se cultivaron en placas de Petri con agar extracto de malta (EMA) y se mantuvieron a 28 °C hasta la colonización completa de la caja.

Determinación de la tasa de extensión radial de los HPB en medio con paraquat

Para determinar la tasa de extensión radial (TER) de los HPB, se colocó un disco de agar con micelio (5 mm de diámetro) en el centro de una placa de Petri (9 cm de diámetro) con medio mínimo de sales y peptona (MMSP: fosfato monobásico de potasio 5 g/l, sulfato de magnesio 0,4 g/l, sulfato de amonio 10 g/l, cloruro de sodio 10 g/l, peptona de caseína 2 g/l, dextrosa 1 g/l y agar bacteriológico 16 g/l) adicionado con paraquat (esterilizado con filtro de jeringa marca Acrodisc® Syringe tamaño de poro 0,2 µm), a una concentración de 0, 50, 150, 250, 350, 450 y 550 mg/l. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento y se mantuvieron en incubación a 28 °C. Para obtener la TER se midió el crecimiento micelial diariamente utilizando un vernier (Mitutoyo® ± 0,05 mm, Japón) hasta la colonización completa de la caja. La tolerancia de los HPB al paraquat se determinó sobre la base de la ausencia o la presencia del crecimiento micelial a las distintas concentraciones del herbicida.

Para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se determinó la concentración más alta a la cual se observó crecimiento. Las cantidades de paraquat aplicadas en los experimentos posteriores se determinaron tomando en cuenta la mitad de la CMI. También se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento mediante la fórmula $[(DCC - DCT)/DCC] \times 100$, donde DCC fue el diámetro de la colonia control (sin paraquat) y DCT el del diámetro de la colonia tratada.

Cultivos de HPB en medio líquido con paraquat

Para los ensayos de degradación del paraquat se prepararon preinóculos de las cepas que se mostraron tolerantes agregando 8 discos de agar con micelio (5 mm de diámetro) a 3 matraces con 30 ml de medio líquido EMA. Estos se mantuvieron a 28 °C y 125 rpm durante 2,5 días en el caso de *C. laeve* ECS-91, 5 días en el de *P. tricholoma* ECS-58, 6 días en el de *P. tricholoma* ECS-64 y 13,5 días en el de *D. citrispora* ECS-77. A estos tiempos, el cultivo de cada cepa se encuentra a la

mitad de la fase exponencial del crecimiento. Transcurridos esos tiempos, el micelio producido en los matraces se filtró (bajo condiciones asépticas) y se trituró en 30 ml de agua destilada estéril hasta obtener una suspensión homogénea.

Posteriormente, se utilizó 1 ml de esas suspensiones para inocular matraces Erlenmeyer con 30 ml de MMSP, los que se mantuvieron en agitación a 125 rpm y 28 °C durante todo el experimento. Después de 3 días de incubación, se agregó el paraquat a una concentración de 25 mg/l en los cultivos de *C. laeve* ECS-91 y de *D. citrispora* ECS-77, y de 75 mg/l en los cultivos de *P. tricholoma* ECS-58 y ECS-64. Estas concentraciones se determinaron luego de calcular las CMI a partir de los experimentos de TER. Se realizaron muestreos por triplicado a los 3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación. Se utilizaron 2 testigos: medio de cultivo sin inocular y el cultivo del hongo inactivado por esterilización, ambos con las mismas concentraciones de paraquat a las que se expuso cada cepa. Todas las muestras fueron filtradas (filtros Whatman, grado 6) y centrifugadas (5000 rpm durante 10 min) a 4 °C. El micelio filtrado se utilizó para la determinación de la biomasa mediante la medida del peso seco y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de paraquat y la actividad de las enzimas lacasa, manganoso-peroxidasa, lignina-peroxidasa, aril alcohol oxidasa y peroxidasa versátil (PVer).

Determinación del paraquat

Para determinar la concentración del paraquat se utilizó glucosa como agente reductor, según lo descrito en el método de Kesari et al.²², con algunas modificaciones: se emplearon 2 ml de H₂O, 0,5 ml de solución reductora y 0,5 ml de muestra. La mezcla de reacción se calentó en baño maría a 70 °C durante 5 min y se midió la absorbancia a 600 nm.

Actividad enzimática

La actividad lacasa (Lac) se determinó utilizando una mezcla de reacción con 2,6-dimetoxifenol (DMP) 50 mM en solución amortiguadora de acetato sódico 200 mM pH 5, H₂O y extracto enzimático. La oxidación del DMP fue monitorizada por el incremento de la absorbancia a 469 nm durante 2 min ($\epsilon_{469} = 49.600 \text{ l/M.cm}$)⁴³.

La actividad aril alcohol oxidasa (AAO) se determinó mediante la oxidación del alcohol veratrílico 25 mM en solución tampón de fosfato sódico 500 mM pH 6, H₂O y extracto enzimático. La reacción se monitorizó por 2 min a una absorbancia de 310 nm ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ l/M.cm}$)³¹.

La actividad manganoso-peroxidasa (MnP) se determinó utilizando una mezcla de reacción con sulfato manganoso tetrahidratado (MnSO₄ 4H₂O) 20 mM en solución amortiguadora de malonato sódico 100 mM pH 4,5, H₂O₂ 10 mM, H₂O y extracto enzimático. La oxidación se midió por espectrofotometría durante 1 min a una absorbancia de 270 nm ($\epsilon_{270} = 1.159 \text{ l/M.cm}$)⁴⁸.

La LiP se midió usando solución de reacción con alcohol veratrílico 50 mM en una solución amortiguadora de tartrato de sodio 200 mM pH 3, H₂O₂ 100 mM, H₂O y extracto enzimático. El cambio de absorbancia se monitorizó a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ l/M.cm}$) durante 2 min⁴².

Por último, la actividad PVer se determinó mediante la oxidación del reactivo black 5 1 mM en solución amortiguadora de malonato de sodio 200 mM pH 3, H₂O₂ 10 mM, H₂O y extracto enzimático. Se monitorizó el cambio de absorbancia a 598 nm ($\epsilon_{598} = 30.000 \text{ l/M.cm}$) durante 5 min³⁶.

En todos los casos, una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto.

Degradación del paraquat en medio de cultivo libre de células (MCLC)

Para los ensayos de degradación del paraquat con MCLC se prepararon preinóculos de las cepas que mostraron mayor degradación del compuesto y mayor actividad enzimática, tal como se describe en el apartado anterior. Estos preinóculos se mantuvieron a 28 °C, en agitación constante a 125 rpm durante 5 (*P. tricholoma* ECS-58) o 13,5 días (*D. citrispora* ECS-77). Transcurridos esos tiempos, el micelio producido en los matraces se filtró (bajo condiciones asépticas) y trituró en 30 ml de agua destilada estéril hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, se utilizó 1 ml de estas suspensiones para inocular matraces Erlenmeyer con 30 ml de medio Kirk. El material fue colocado en agitación (125 rpm a 28 °C en un cuarto de incubación) durante 5 o 13,5 días, según se indicó anteriormente. Luego se procedió a filtrar (filtros Whatman, grado 6) cada uno de los caldos de cultivo para obtener el MCLC. A cada matraz se le agregó 50 mg/l de paraquat y se mantuvieron en agitación a 125 rpm y 28 °C durante 24 h. Se midió la degradación del compuesto cada 3 h por el método de Kesari et al.²².

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, bajo las mismas condiciones. Para los análisis estadísticos se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23. En todos los casos se realizó un ANOVA multivariado o unifactorial, y los datos se analizaron mediante una comparativa entre la prueba de Tukey y la prueba de Bonferroni, ambas con un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Crecimiento e inhibición a diferentes concentraciones de paraquat

Para determinar el efecto del paraquat sobre el crecimiento de los HPB, estos se sembraron en un medio adicionado con diferentes concentraciones del herbicida y se midió la TER. Los hongos *P. gilvus* ECS-61, *G. barbipes* ECS-85, *C. olla* ECS-86 y *G. frondosa* ECS-703 no crecieron en ninguna de las concentraciones de paraquat a las que fueron sometidos. Por otro lado, las cepas que presentaron tolerancia al herbicida fueron *D. citrispora* ECS-77 y *C. laeve* ECS-91, las cuales tuvieron crecimiento en presencia de 50 mg/l del herbicida, y *P. tricholoma* ECS-58 y ECS-64, que lo hicieron a 150 mg/l.

Tabla 1 Inhibición del crecimiento (%) de diversos aislados de HPB en medio EMA con paraquat

Cepas	Concentración de paraquat (mg/l)					
	50	150	250	350	450	550
ECS-58	24,78	43,52	100	100	100	100
ECS-61	100	100	100	100	100	100
ECS-64	28,16	45,95	100	100	100	100
ECS-77	86,02	100	100	100	100	100
ECS-85	100	100	100	100	100	100
ECS-86	100	100	100	100	100	100
ECS-91	35,82	100	100	100	100	100
ECS-703	100	100	100	100	100	100

En la [tabla 1](#) se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada cepa de HPB a diferentes concentraciones del paraquat. El resultado que se muestra es la media de 3 experimentos independientes.

Las cepas *D. citrispora* ECS-77 y *C. laeve* ECS-91 crecieron únicamente en presencia de 50 mg/l del herbicida y mostraron un porcentaje de inhibición del 86 y el 35,8%, respectivamente, mientras que las cepas de *P. tricholoma* ECS-58 y ECS-64 crecieron con hasta 150 mg/l del herbicida, y tuvieron un 43,5 y un 45,9% de inhibición, respectivamente.

Las cepas *P. gilvus* ECS-61, *G. barbipes* ECS-85, *C. olla* ECS-86 y *G. frondosa* ECS-703 presentaron un 100% de inhibición en todas las concentraciones, por lo tanto, no se utilizaron en los ensayos de degradación posteriores.

Ensayos de degradación del paraquat por HPB en medio líquido

Las cepas que mostraron los mayores porcentajes de degradación del herbicida fueron *P. tricholoma* ECS-58 (32,3%) y *D. citrispora* ECS-77 (47,6%); esta última tasa de degradación se logró a los 12 días de cultivo. La cepa ECS-64, que también corresponde a *P. tricholoma* no presentó degradación durante el cultivo ([fig. 1](#)). También se analizaron en las cepas seleccionadas los valores de producción de biomasa durante 12 días de cultivo. La cepa *D. citrispora* ECS-77 presentó una pérdida de biomasa de $1,6 \pm 0,1 \text{ g/l}$ hacia el día 12 de cultivo, siendo la cepa con menor de biomasa al día 12 ($p > 0,05$). Las cepas *P. tricholoma* ECS-58 y ECS-64 mostraron los valores de biomasa más altos, sin diferencias significativas entre ellas según la prueba de Tukey ([fig. 2](#)). En ambos controles utilizados (medio de cultivo sin inocular y micelio inactivado por esterilización) la cantidad de paraquat en el medio permaneció constante (datos no mostrados), lo cual confirma que no hubo evaporación del paraquat ni adherencia del compuesto al micelio.

Actividad enzimática durante la degradación del paraquat por HPB en cultivo líquido

Se encontró actividad Lac durante los ensayos de degradación en la mayoría de los extractos enzimáticos, con excepción del de la cepa *C. laeve* ECS-91. El extracto enzimático de la cepa ECS-64 de *P. tricholoma* presentó los

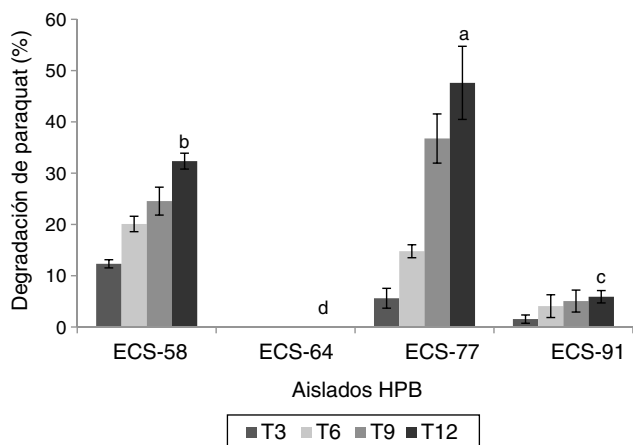


Figura 1 Degradación de paraquat (%) por HPB cultivados en medio líquido a 26-28 °C, 125 rpm, partiendo de concentraciones de 25 ppm (ECS-77, ECS-91) y 75 ppm (ECS-58, ECS-64). Se ajustó un modelo polinomial y se realizó una comparación múltiple basada en la prueba de Tukey. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre cepas en el día 12 ($p < 0,05$).

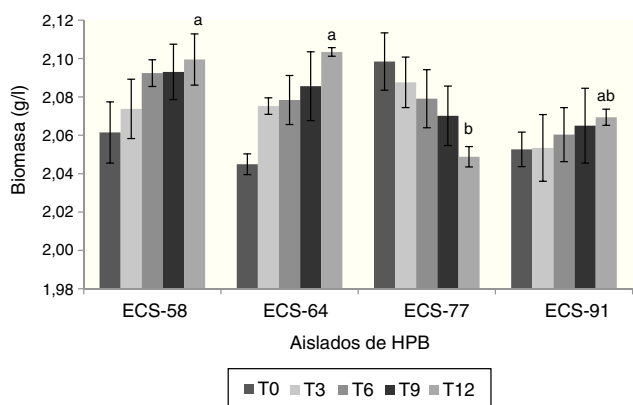


Figura 2 Producción de biomasa de HPB durante la degradación de herbicida paraquat después de 12 días de incubación a 26-28 °C en cultivo líquido, a 125 rpm. Se ajustó un modelo polinomial y se realizó una comparación múltiple basada en la prueba de Tukey. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre cepas en el día 12 ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó para todos los tiempos en todas las cepas; solo se muestra el análisis del tiempo 12.

valores más altos de actividad a los 6 días de incubación (20,56 U/ml) ($p < 0,05$) (fig. 3).

Las cepas *P. tricholoma* ECS-64 y *D. citrispora* ECS-77 mostraron valores de actividad de MnP significativamente más altos que las demás cepas ($p < 0,05$) a los 3 días de incubación, con 14,38 U/ml y 5,46 U/ml, respectivamente. *C. laeve* ECS-91 no presentó actividad MnP (fig. 4). Ninguna de las cepas analizadas presentó actividad AAO, LiP ni PVer.

Sobre la base de los resultados anteriores, se decidió evaluar en los siguientes ensayos únicamente los sobrenadantes libres de células de *P. tricholoma* ECS-58 y *D. citrispora* ECS-77, las cuales disminuyeron la concentración del herbicida paraquat durante los 12 días de crecimiento y mostraron al

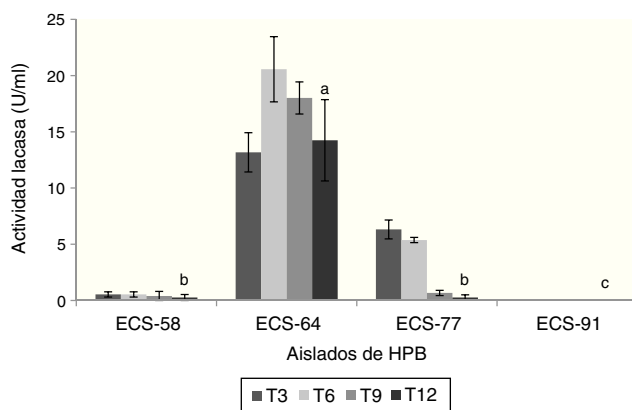


Figura 3 Actividad lacasa del extracto enzimático de HPB en medio líquido en presencia de paraquat, a 26-28 °C y 125 rpm. Se ajustó un modelo polinomial y se realizó una comparación múltiple basada en la prueba de Tukey. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre cepas en el día 12 ($p < 0,05$).

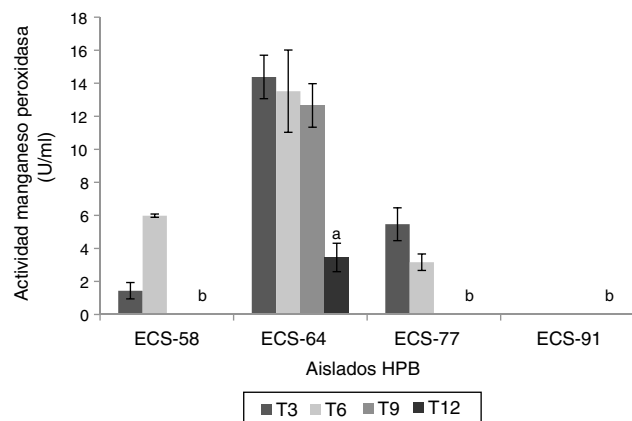


Figura 4 Actividad manganeso peroxidasa del extracto enzimático de HPB en medio líquido en presencia de paraquat, a 26-28 °C, 125 rpm. Se ajustó un modelo polinomial y se realizó una comparación múltiple basada en la prueba de Tukey. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre cepas en el día 12 ($p < 0,05$).

menos una de las actividades enzimáticas evaluadas (lacasa y manganeso peroxidasa) en su extracto celular.

Ensayos de degradación del herbicida paraquat por HPB en MCLC

Para demostrar que la disminución del paraquat se debió a la producción de enzimas extracelulares y no a la internalización del compuesto en las células del hongo, se realizó el ensayo de degradación con el MCLC. Los resultados obtenidos (fig. 5) muestran que con el MCLC de *D. citrispora* ECS-77 se produjo degradación del paraquat, con un valor máximo de compuesto degradado del 44,1% a las 24 h de incubación ($p < 0,05$), y una velocidad de degradación de 1,930/t ($r = 0,99$). Por el contrario, el MCLC de *P. tricholoma* ECS-58 no presentó degradación de paraquat (datos no mostrados).

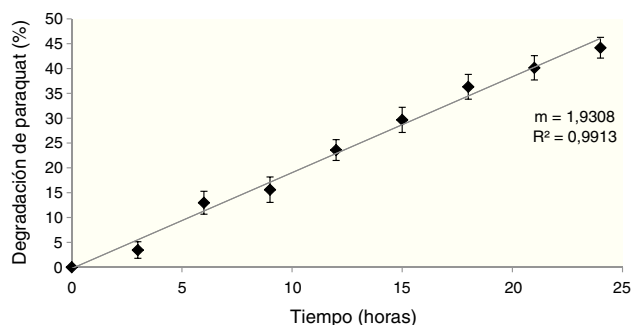


Figura 5 Degradación de paraquat en medio de cultivo libre de células (MCLC) de la cepa ECS-77, a 28 °C, 125 rpm, en medio Kirk. La concentración inicial de paraquat fue de 50 mg/l.

Discusión

La primera fase de este trabajo consistió en seleccionar cepas de HPB que fueran tolerantes al paraquat. En esta investigación, el crecimiento micelial se vio afectado en la mayoría de las cepas evaluadas a las concentraciones de paraquat elegidas. Cuatro de las 8 cepas empleadas no toleraron ninguna de las concentraciones. Las 4 cepas restantes lograron crecer a 50, 100 y 150 mg/l. La mayor concentración reportada en ensayos de degradación realizados en el laboratorio del herbicida paraquat es de 100 ppm²³.

Nuestros resultados se asemejan a los reportados por Tortella et al.⁴⁵, quienes evaluaron la tolerancia de 11 cepas de HPB nativas de Chile al 2,4-diclorofenol, ya que el 100% de esos aislados toleraron 25 mg/l, pero únicamente el 64% de ellos fue tolerante a 50 mg/l. A las concentraciones más altas no se observó crecimiento de los aislados. En este sentido, se puede resaltar que el comportamiento de los aislados de nuestro trabajo fue semejante a los del estudio recién citado, ya que al aumentar la concentración del compuesto el crecimiento micelial se vio inhibido en ambos casos.

Las 4 cepas que fueron medianamente tolerantes al paraquat (*D. citrispora* ECS-77 y *C. laeve* ECS-91, que pudieron crecer en presencia de 50 mg/l del herbicida, y *P. tricholoma* ECS-58 y ECS-64, que pudieron crecer hasta con 150 mg/l) se seleccionaron para evaluar sus actividades enzimáticas y su capacidad para degradar dicho herbicida cuando este se encuentra a la mitad de la concentración máxima que lograron tolerar.

Una de esas 4 cepas no degradó el herbicida, las otras 3 lograron niveles de degradación que fueron desde el 25% hasta el 50%. Similar degradación se observó en el caso del fenantreno por la lacasa de *T. versicolor*, donde se obtuvo un 35% de degradación del compuesto en 72 h de cultivo²⁰. En ese mismo estudio se evaluó el uso de mediadores rédox como agentes que aceleran la biodegradación del compuesto, utilizando ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y 1-hidroxybenzotriazol (HTB); estos llevaron a incrementos de hasta el 40% en la degradación del fenantreno.

Para trabajos futuros, puede ser de importancia el uso de mediadores rédox para intentar mejorar los porcentajes de degradación de paraquat. Los resultados obtenidos en

esta investigación se asemejan al informado respecto de la bacteria *P. putida*, la cual logró una degradación del 47,3% de Gramoxone® Syngenta, nombre de la fórmula comercial del paraquat. Las tasas de degradación aumentaban considerablemente (97%) con el uso de carbón activado, el cual absorbe gran parte del compuesto²³.

Pizzul et al.³² evaluaron la degradación de glifosato con las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa en ausencia de mediadores rédox y demostraron que las enzimas por sí solas no tienen ningún efecto sobre el herbicida. Cuando los mediadores MnSO₄ y Tween 80 se añadieron a la reacción en la que se evaluó la actividad de la lacasa, se obtuvo hasta un 80% de degradación en 24 h, mientras que se observó un 100% de degradación cuando se incluyeron en la mezcla de reacción en la que se determinó la actividad de la manganeso-peroxidasa esos mismos mediadores o H₂O₂.

Las 3 cepas que presentaron la mayor degradación de paraquat corresponden a especies poco estudiadas en el ámbito de la biodegradación de recalcitrantes. De *P. tricholoma* existe un reporte de decoloración de remazol brillante R Blue²⁵. Es importante mencionar que 2 de las 3 cepas con las que se obtuvo mayor degradación de paraquat no habían sido evaluadas anteriormente como potenciales biodegradadoras, por lo tanto, este es el primer reporte de la utilización de *D. citrispora* y *C. laeve* para este fin.

Además, se registró la producción de biomasa de cada una de las cepas de HPB durante la degradación bajo las condiciones de cultivo establecidas. *D. citrispora* ECS-77 mostró disminución de su biomasa durante la degradación; sin embargo, obtuvo el porcentaje de degradación más alto tras 12 días de cultivo (fig. 2). Por tanto, podemos proponer que la degradación del compuesto no depende directamente del crecimiento del hongo, sino de la secreción de enzimas extracelulares por parte de aquel. En un estudio previo se encontró que el aumento de la actividad enzimática lacasa es inversamente proporcional a la producción de biomasa en presencia del herbicida paraquat¹⁷.

Los HPB *P. tricholoma* ECS-58 y *D. citrispora* ECS-77 en el cultivo con paraquat mostraron aumentos en las actividades enzimáticas Lac, y MnP durante los 12 días de crecimiento. Cuando el hongo creció en presencia de paraquat, se notó un aumento en la actividad enzimática del día 3 al 12. Se ha reportado que la presencia de diferentes contaminantes ambientales (agroquímicos, compuestos industriales y solventes) ocasionan aumento de la actividad Lac del hongo *T. versicolor*²⁹. El incremento de la actividad puede deberse a que los compuestos actúan como inductores de la producción enzimática.

En las cepas *P. tricholoma* ECS-58 y *D. citrispora* ECS-77 se detectó la enzima MnP. Diversos trabajos de investigación asocian la baja o nula actividad de enzimas ligninolíticas de tipo peroxidasa a las condiciones de crecimiento o a la composición del medio de cultivo, que no favorecería la secreción de las enzimas en el medio extracelular^{38,50}.

La composición de las enzimas constituyentes del sistema ligninolítico depende de cada especie; algunos hongos de pudrición degradan selectivamente la lignina, por tanto, estas especies carecen de una o más enzimas ligninolíticas¹⁰.

Sobre la base de estudios de laboratorio, se ha descrito que la síntesis y la secreción de las enzimas ligninolíticas al medio extracelular ocurren cuando hay niveles limitados de carbono o nitrógeno. Además, se ha descrito que la

producción de estas enzimas es óptima en presencia de altas cantidades de oxígeno, pero es reprimida por la agitación en cultivo líquido sumergido^{9,16}. Por tanto, la implementación de un proceso óptimo de producción enzimática dependerá de las características del organismo con el que se trabaje, para optimizar la producción proporcionándole las condiciones más favorables.

C. laeve ECS-91 no presentó ninguna de las actividades medidas, pero sí una ligera disminución en la concentración del herbicida. Esto presupone la participación de un sistema intracelular (citocromo P-450, por ejemplo) vinculado con la degradación de contaminantes^{18,40}, o bien la participación de un sistema diferente, y permitiría explicar que haya habido degradación, aun cuando esta cepa no presentó actividad ligninolítica bajo las condiciones de cultivo empleadas en el ensayo.

Solamente el extracto libre de células de *D. citrispora* ECS-77 disminuyó la concentración de paraquat. Yanez-Montalvo et al.⁴⁹ evaluaron extractos enzimáticos libres de células de 4 cepas de *Auricularia fuscosuccinea* y encontraron del 94 al 100% de degradación de endosulfán después de 8 días de incubación. Aunque el porcentaje máximo de degradación del contaminante aquí observado fue menor (44% con una concentración inicial de herbicida de 50 mg/l), cabe destacar que este nivel de degradación se logró en solo 24 h.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten evaluar el potencial de degradación de 2 cepas que hasta el momento no habían sido descritas como degradadoras de compuestos recalcitrantes. Estudios posteriores que incluyan el uso de mediadores redox y que amplíen los tiempos de incubación nos permitirán obtener niveles más altos de degradación y poder indagar en la vía por la cual se lleva a cabo dicho proceso.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El primer autor extiende un sincero reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por la concesión de la beca PDNAL-227794. Se agradece a la QFB. Lilia Moreno Ruiz, al M.C. René Humberto Gallegos y a la M.C. Luz Verónica García Fajardo, su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Boyle D. Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungi. *J Environ Manage.* 2006;80:380–6.
- Choi SH, Moon S-H, Gu MB. Biodegradation of chlorophenols using the cell-free culture broth of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized in polyurethane foam. *J Chem Technol Biotechnol.* 2002;77:999–1004.
- Chong MN, Jin B, Chow CWK, Saint C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Res.* 2010;44:2997–3027.
- Cupul WC, Abarca GH, Vázquez RR, Salmenes D, Hernández RG, Gutiérrez EA. Response of ligninolytic macrofungi to the herbicide atrazine: Dose-response bioassays. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:348–57.
- Davila G, Vázquez-Duhalt R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico.* 2006;30:29–55.
- Dighton J. Fungi in ecosystem process. *Mycology series Vol. 17.* New Orleans: Tulane University; 2003.
- Domínguez O, Leal MR, Manzano AM, Sánchez MI, Sánchez A, Torres G, Arguelles J, Romeu A, Palacios J, Dierksmeier G, Guerra G. Biodegradación de DDT por dos cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2010;41:1–12.
- Elisashvili V, Kachlishvili E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. *J Biotechnol.* 2009;144:37–42.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35:1531–8.
- Eriksson K-EL, Blanchette RA, Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990.
- Evans CS, Hedger JN. Degradation of plant cell wall polymers. En: Gadd GM, editor. *Fungi in bioremediation.* Cambridge: Cambridge University Press; 2001 p. 1–26.
- Godliving YS, Mtui GYS. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Sci Res Essays.* 2012;7:1544–55.
- Goswami S, Vig K, Singh DK. Biodegradation of α and β endosulfan by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere.* 2009;75:883–8.
- Han M-J, Choi H-T, Song H-G. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J Microbiol.* 2004;42:94–8.
- Harms H, Schlosser D, Wick LY. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:177–92.
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* 2004;39:1415–9.
- Jaszek M, Grzywnowicz K, Malarczyk E, Leonowicz A. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pestic Biochem Physiol.* 2006;85:147–54.
- Jauregui J, Valderrama B, Albores A, Vazquez-Duhalt R. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot Fungi. *Biodegradation.* 2003;14:397–406.
- Jiang X, Zeng G, Huang D, Chen DL, Liu Y, Huang F, Li JB, Xi B, Liu HL. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006;22:909–13.
- Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46:313–7.

21. Kamei I, Takagi K, Kondo R. Degradation of endosulfan and endosulfan sulfate by white-rot fungus *Trametes hirsuta*. *J Wood Sci*. 2011;57:317–22.
22. Kesari R, Rai M, Gupta VK. Spectrophotometric method for determination of paraquat in food and biological samples. *J AOAC Int*. 1996;80:388–91.
23. Kopytko M, Chalela G, Zauscher F. Biodegradation of two commercial herbicides (*Gramoxone* and *Matancha*) by the bacteria *Pseudomonas putida*. *Electron J Biotechnol*. 2002;5:1–2.
24. Li F, Wang X, Liu C, Li Y, Zeng F, Liu L. Reductive transformation of pentachlorophenol on the interface of subtropical soil colloids and water. *Geoderma*. 2008;148:70–8.
25. Machado KMG, Matheus DR, Bononi VLR. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian J Microbiol*. 2005;36:246–52.
26. Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol*. 2005;8:195–204.
27. Meunier L, Canonica S, von Gunten U. Implications of sequential use of UV and ozone for drinking water quality. *Water Res*. 2006;40:1864–76.
28. Mir-Tütusa JA, Masís-Mora M, Corcellas C, Eljarrat E, Barceló D, Sarráa M, Caminale G, Vicenta T, Rodríguez-Rodríguez C. Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Sci Total Environ*. 2014;500:235–42.
29. Mougín C, Kollmann A, Jolivalt C. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol Lett*. 2002;24:139–42.
30. Mueller GM, Schmit JP, Leacock PR, Buyck B, Cifuentes J, Desjardín DE, Halling RE, Hjortstam K, Iturriaga T, Larsson KH, Lodge DJ, May TW, Minter D, Rajchenberg M, Readhead SA, Ryvarden L, Trappe JM, Watling R, Wu Q. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodivers Conserv*. 2007;16:37–48.
31. Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:2166–74.
32. Pizzul L, Castillo M del P, Stenström J. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*. 2009;20:751–9.
33. Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57:20–33.
34. Quispe PR, de Carvalho RJ. Degradación del pesticida Paraquat a través del proceso de ozonización. *Rev CENIC Ciencias Químicas*. 2010;41:1–11.
35. Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasil'chenko LG. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Appl Biochem Microbiol*. 2004;40:1–17.
36. Rodríguez E, Nuero O, Guillén F, Martínez A, Martínez M. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol Biochem*. 2004;36:909–16.
37. Saha BC. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. ACS Symposium series. Ebooks; 2004. p. 2–34.
38. Saparrat MCN, Martínez MJ, Cabello MN, Arambarri AM. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:181–5.
39. Sedarati MR, Keshavarz T, Leontievsky AA, Evans CS. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electron J Biotechnol*. 2003;6:1–2.
40. Silva Coelho J, de Oliveira AL, Marques de Souza CG, Bracht A, Peralta RM. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2010;64:156–61.
41. Singh MP, Vishwakarma SK, Srivastava AK, Singh MP, Vishwakarma SK, Srivastava AK. Bioremediation of direct blue 14 and extracellular ligninolytic enzyme production by white rot fungi: *Pleurotus* spp. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–4.
42. Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H(2)O(2)-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:2280–4.
43. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett Appl Microbiol*. 2001;32:331–5.
44. Tortella GR, Diez MC, Duran N. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit Rev Microbiol*. 2005;31:197–212.
45. Tortella GR, Rubilar O, Gianfreda L, Valenzuela E, Diez MC. Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:2805–18.
46. Valentín L, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2006;58:15–21.
47. Ware GW, Whitacre DM. The pesticide book. MeisterPro Information Resources. 2004.
48. Wariishi H, Valli K, Gold MH. Manganese (III) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem*. 1992;267:23688–95.
49. Yanez-Montalvo A, Vazquez-Duhalt R, Cruz-Lopez L, Calixto-Romo M, Sanchez J. Purification and partial characterization of a phenol oxidase from the edible mushroom *Auricularia fuscosuccinea*. *Jacobs J Enzymol Enzym Eng*. 2015;1:1–6.
50. Zucca P, Rescigno A, Olianias A, MacCioni S, Sollai FA, Sanjust E. Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. *J Mol Catal B Enzym*. 2011;68:216–22.