

5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *PLEUROTUS OSTREATUS* EN PRESENCIA DE BIFENILOS POLICLORADOS

Martha Gayosso Canales¹ Fernando Esparza García², Elvira Ríos Leal¹ y Refugio Rodríguez Vázquez¹

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Deleg. Gustavo A. Madero 07360 México, D. F.

²Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. Av. Universitaria km 1. Rancho Universitario, C. P. 43600. Tulancingo, Hgo.

<gayossoc@yahoo.com.mx>, <erios@cinvestav.mx>, <fesparza@cinvestav.mx>, <rrodrig@cinvestav.mx>

RESUMEN

Se evaluó el efecto de los bifenilos policlorados (BPC) sobre la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido. Las actividades manganeso peroxidasa (MnP), lacasa (Lac) y versátil peroxidasa (VP) fueron cuantificadas por espectrofotometría. VP fue inducida 27 veces a los 12 días de cultivo, Lac 11.4 veces, y aunque MnP no registró inducción la actividad aumentó al adicionar CuSO₄ (250 mg/l), bagazo de caña (2.5 g/l) y Tween 80 (3,500 mg/l); también la actividad VP fue mejorada con la adición de Tween 80 (13 mg/l) a pH 4, mientras que Lac fue mayor a pH 6 y 100 rpm.

Palabras clave: versátil peroxidasa (VP), lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP), inducción.

INTRODUCCIÓN

Durante la década pasada se desarrolló un gran interés en el uso de los hongos de pudrición blanca (HPB) con propósitos de biorremediación, esto debido a sus sistemas enzimáticos ligninolíticos, que también degradan un amplio grupo de contaminantes ambientales. Aunque inicialmente la atención se centró en *Phanerochaete chrysosporium*, especies de otros géneros mostraron potencial para la biorremediación, por ejemplo *Trametes*, *Bjerkandera* y *Pleurotus*. Actualmente existe gran interés y preocupación pública por la persistencia en el ambiente de compuestos aromáticos clorados, que demandan la intervención científica y tecnológica para hallar métodos efectivos de eliminarlos. Se estima que diez millones de kilogramos de bifenilos policlorados persisten en el ambiente, mas no hay tecnologías de biorremediación de BPC disponibles. En México hay amplias áreas contaminadas con éstos y grandes cantidades de aceite gastado de transformador almacenadas, esperando un adecuado tratamiento de remediación y/o disposición (Rojas Avelizapa *et al.* 1999).

Algunos microorganismos han demostrado ser eficientes en la degradación de BPC, entre ellos los HPB, que han probado ser capaces de transformar o mineralizar un grupo amplio de contaminantes donde, en la mayoría de los casos, están implicadas las enzimas ligninolíticas. Otro aspecto importante que favorece la aplicación del género *Pleurotus* en sistemas de biorremediación es que las lacasas de *T. versicolor* y *P. ostreatus* catalizan la degradación de bifenilos policlorados hidroxilados, los cuales son metabolitos tóxicos de los BPC (Keum y Li 2004). Sin embargo, poco se conoce acerca del efecto de *P. ostreatus* en la degradación de BPC y de cómo afectan las condiciones del cultivo, como son la relación carbono/nitrógeno (C/N) y la adición de surfactantes al medio para mejorar la disponibilidad de estos compuestos. Tampoco se sabe cómo es afectado el perfil enzimático en presencia de BPC.

El género *Pleurotus* comprende especies de hongos con aplicaciones potenciales en biorremediación, no obstante la mayoría de estudios han sido efectuados en condiciones de laboratorio. Es necesario más trabajo en este campo antes de que una tecnología práctica pueda ser desarrollada. El sistema ligninolítico de este grupo de hongos está compuesto por enzimas oxidativas no específicas; las sobresalientes capacidades de MnP, Lac y VP, hacen a estas enzimas interesantes para su aplicación en la biorremediación, además de que pueden ser usadas de manera segura en muchas condiciones (Cohen *et al.*

2002a). Por lo anterior el objetivo de este estudio fue determinar si los bifenilos policlorados inducen la producción enzimática de *P. ostreatus* en cultivo líquido y verificar si ocurre la degradación de los bifenilos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para este estudio se usó la cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, ATCC 38540, resemebrada en agar papa dextrosa (PDA) (Difco, Detroit, MI, USA).

Condiciones de cultivo

Cuarenta mililitros de medio de cultivo constituido por 5 g de dextrosa, 5 g de extracto de levadura por litro de medio contenidos en matraces Erlenmeyer de 125 ml (Guillén Navarro *et al.* 1998), fueron inoculados con 1 ml de una solución acuosa de micelio de *P. ostreatus* (obtenido al mezclar micelio crecido en agar PDA en caja Petri de 4 cm de diámetro con 15 ml de agua estéril), luego los matraces fueron incubados a 28°C por 20 días en un incubador orbital.

Diseño experimental

Para probar el efecto de las diferentes condiciones de cultivo se utilizó un diseño factorial fraccionado 2^{7-3} (Montgomery 2003), mediante 16 tratamientos con BPC emulsionados en Tween 80, siete factores a dos niveles de variación (tabla 1), con tres repeticiones c/u y dos controles: uno abiótico (esterilizado al momento de adicionar los BPC) y otro sin BPC, emulsionados en el surfactante; en ambos casos se hicieron dos repeticiones para cada tratamiento.

Tabla 1. Factores de variación

Factor	Nivel	
	Bajo (-)	Alto (+)
CuSO ₄ (mg/l)*	150	250
MnSO ₄ (mg/l)	50	200
Paja de trigo (g/l)	0	2.5
Bagazo de caña (g/l)	0	2.5
pH	4	6
Velocidad de agitación (rpm)	100	200
***Tween 80 (mg/l)	13	3,500

* 150 y 250 mg/l CuSO₄ equivalen a 940 y 1,566 µM respectivamente.

** 50 y 250 mg/l MnSO₄ equivalen a 330 y 1,323 µM respectivamente.

*** El Tween 80 únicamente fue añadido en los tratamientos con BPC.

Después de siete días de incubación (asignados como día cero para los análisis) fueron adicionados al caldo de cultivo, bajo condiciones estériles, los BPC (mezcla de aceites de transformador donado por la empresa DEBISA) emulsionados en Tween 80.

Actividad Enzimática

Actividad lacasa

Se tomaron 800 µl del extracto enzimático en tubos de ensayo y se adicionaron a cada tubo 100 µl de 2,2 azinobis, 3 etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) 0.5 mM y 100 µl de una solución amortiguadora de acetato de sodio pH 4.5; utilizando como blanco agua desionizada en lugar de ABTS. Finalmente, se leyó la absorción a 436 nm (ϵ_{436} 29,300 l mol⁻¹ cm⁻¹). Una unidad de lacasa es definida como un micromol de ABTS oxidado por minuto (Tinoco *et al.* 2001).

Actividad manganeso peroxidasa

En un tubo de ensayo de 4 ml de capacidad se hicieron reaccionar 800 µl de la solución reguladora 50 mM de malonatos con 100 µl de sulfato de manganeso (MnSO₄) 1 mM, 100 µl del extracto y 5 µl de H₂O₂ 20 mM. Se monitoreó el cambio de absorción a 270 nm (ϵ_{270} 11,590 l mol⁻¹ cm⁻¹) (Wariishi *et al.* 1992).

Actividad versátil peroxidasa

La actividad VP se midió por la formación del complejo Mn⁺³-tartrato (ϵ_{238} 6,500 mol⁻¹ cm⁻¹) durante la oxidación de 0.1 mM Mn⁺² (como MnSO₄) en 100 mM de solución reguladora de tartrato de sodio, pH 5, en presencia de 0.1 mM de H₂O₂ (Rodríguez *et al.* 2004).

Determinación de la proteína total

Se prepararon soluciones de albúmina de suero bovino a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60 ml/l en NaCl 0.15 M. Para preparar el reactivo de proteína, 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 fueron disueltos en 50 ml de etanol a 95%, en esta solución se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico a 85% (P/V), y la solución resultante fue llevada a un volumen final de 1 litro.

Cuantificación de la proteína: 0.1 ml de sobrenadante del caldo de cultivo fue colocado en un tubo de ensayo de 12 x 100 mm, luego se añadió 1 ml de reactivo de proteína y el contenido fue mezclado en un agitador, se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos y antes de 1 hora (Bradford 1976). Más tarde se determinó la actividad enzimática específica (U/mg de proteína).

Análisis de los datos

A los datos obtenidos se les hizo un análisis de varianza (GLM), un análisis de regresión (REG) y una separación de medias por diferencia mínima significativa, con el paquete estadístico SAS 8.0.

RESULTADOS

En general, la actividad enzimática de los tratamientos con BPC fue afectada por las condiciones de cultivo ($P \leq 0.05$). Así la actividad VP fue alterada por la adición de surfactante y el pH, siendo favorables la concentración de 13 mg/l de Tween 80 y el pH 4. Mientras que en ausencia de BPC, únicamente fue afectada por la velocidad de agitación mostrando efecto positivo la velocidad de 100 rpm. Además, bajo ciertas condiciones de cultivo se observó un incremento sustancial de la actividad VP ocasionada por la presencia de BPC en el medio de cultivo; la tabla 2 muestra los tratamientos en los que se presentó la inducción. En la tabla 3 se presentan las condiciones de cultivo para los tratamientos que manifestaron inducción de la actividad. Aunque no se observó una tendencia específica bajo las condiciones en las que se hizo el estudio, la inducción predominó cuando la concentración de Tween 80 fue 13 mg/l y no hubo paja de trigo en el caldo de cultivo.

Es de destacar que el incremento mayor fue conseguido cuando se aplicaron los niveles bajos de todas las condiciones de cultivo. Para considerar el incremento se seleccionaron los procesos que registraron más de cinco veces la actividad enzimática de los tratamientos sin BPC-Tween 80.

Tabla 2. Inducción de la actividad específica de la VP de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido con diversos tiempos de incubación

Tiempo de incubación (días)	Tratamiento	Actividad específica con BPC (U/mg)	Actividad específica sin BPC (U/mg)	Incremento (veces)
4	15	22.97	3.209	7.16
12	1	27.08	ND	27.08
	12	19.88	ND	19.88
16	10	3.24	ND	3.24
	3	7.81	0.96	8.13
20	9	9.64	ND	9.64

Nota: ND = no detectables.

Tabla 3. Condiciones de cultivo de los tratamientos que mostraron inducción de la actividad de VP de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido

Incubación (días)	Tratamiento	CONDICIONES DE CULTIVO						
		CuSO ₄ (mg l ⁻¹)	MnSO ₄ (mg l ⁻¹)	Paja de trigo (mg l ⁻¹)	Bagazo de caña (mg l ⁻¹)	pH	rpm	Tween 80 (mg l ⁻¹)
4	15	50	200	2,500	2,500	4	200	13
12	1	50	50	0	0	4	100	13
	12	150	200	0	2,500	4	100	13
16	10	150	50	0	2,500	6	200	13
	3	50	200	0	0	6	200	13
20	9	50	50	0	2,500	4	200	3,500

Por otra parte, los factores que favorecieron la actividad MnP cuando los BPC estuvieron presentes fueron CuSO₄ (1566 µM), bagazo de caña y el surfactante (3,500 ppm); en tanto que en ausencia del contaminante el único factor que influyó fue el tiempo de incubación, registrando la actividad mayor a los 20 días ($P \leq 0.05$). Al comparar las actividades de los tratamientos con y sin BPC no se observó una inducción de la actividad MnP mayor a cinco veces, sin embargo el mejor tratamiento fue el 16 con 1.28 veces de inducción.

Finalmente, la actividad Lac en presencia de BPC fue alterada por la velocidad de agitación, el pH y el tiempo de incubación, registrando un efecto positivo a pH 6, 100 rpm y 20 días de incubación; en tanto que en ausencia de éstos la actividad enzimática fue mayor en presencia de paja de trigo y bagazo de caña a 12 y 20 días de incubación. Asimismo, cabe señalar que la presencia de los BPC-Tween 80 provocó un efecto inductor en la actividad lacasa de algunos de los casos estudiados (tabla 4). En la tabla 5 se aprecian las condiciones de cultivo en las que se registró inducción de la producción de lacasa. En general se

observó que la actividad fue favorecida por la adición de Tween 80 en una concentración de 3,500 mg/l, por la presencia de paja de trigo, a 200 rpm y pH 6.

Tabla 4. Inducción de la actividad específica de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido con diversos tiempos de incubación

Incubación (días)	Tratamiento	Tratamiento con BPC	Tratamiento sin BPC	Inducción (veces)
		Actividad específica U mg ⁻¹ de proteína	Actividad específica U mg ⁻¹ de proteína	
12	16	3.08	0.27	11.41
20	16	8.41	0.89	9.45
	5	7.78	0.79	9.85

Tabla 5. Condiciones de cultivo de los tratamientos que mostraron inducción de la actividad lacasa de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido

Incubación (días)	Tratamiento	CONDICIONES DE CULTIVO						
		CuSO ₄ (mg l ⁻¹)	MnSO ₄ (mg l ⁻¹)	Paja de trigo (mg l ⁻¹)	Bagazo de caña (mg l ⁻¹)	pH	rpm	Tween 80 (mg l ⁻¹)
12, 20	16	250	200	2,500	2,500	6	200	3,500
20	5	150	50	2,500	0	6	200	3,500

DISCUSIÓN

La presencia de Tween 80 mejora la solubilidad de los BPC en el caldo de cultivo haciéndolos biodisponibles, lo cual podría estar indirectamente estimulando la actividad VP, no obstante la concentración favorable del surfactante es la baja (13 mg/l); por otra parte, como ya es sabido, VP tiene una alta estabilidad con valores de pH entre 4 y 6 (Lú Chau *et al.* 2004); en este estudio se registra una mayor actividad a pH 4. Sin embargo, cuando no hay estrés por la presencia del contaminante la actividad enzimática solo es afectada por la tensión de oxígeno, requiriendo poca tensión. Además, VP se activó por la presencia de BPC, lo que fue confirmado al detectar una actividad enzimática mayor que en su ausencia a los 4, 12, 16 y 20 días de incubación, bajo diferentes condiciones de cultivo.

La mayor inducción de la actividad VP se registró cuando estaban presentes las concentraciones bajas de Cu y Mn (940 y 330 µM, respectivamente), aunque no hay precedente del efecto del Cu sobre esta enzima, en relación con el Mn se sabe que este es innecesario para la producción de VP en *P. ostreatus* (Kamitsuji *et al.* 2005). No obstante se observó inducción de la actividad enzimática (19.88 veces) cuando la concentración de Mn fue 1,327 µM, bajo las condiciones de pH, agitación y concentración de surfactante adecuadas, además de la presencia de 2,500 mg/l de bagazo de caña; por el contrario, cuando el nivel de Mn fue bajo (330 µM), y en las mismas condiciones excepto que el pH era 6, la inducción se redujo a tan solo 3.24 veces. Esto sugiere que las interacciones entre la concentración de Mn, el bagazo de caña y el

pH afectan drásticamente la actividad VP. Asimismo el efecto de la concentración del surfactante es mínimo siempre y cuando se mantengan la concentración baja de Mn y la presencia de bagazo (tabla 3).

También, la presencia de los BPC modifica el efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad de MnP, dado que en ausencia del tóxico la actividad solo se vio afectada por el tiempo de incubación, mientras que en su presencia hubo efecto en la concentración de Cu, de bagazo de caña y de Tween 80. Está documentado qué tipo de sustrato (madera, aserrín, paja) influye en la producción de esta enzima en *Agaricus bisporus* (Lankinen *et al.* 2005); según los resultados obtenidos, el bagazo de caña como cosustrato en cultivo líquido de *P. ostreatus* es mejor que la paja de trigo para incrementar la actividad MnP cuando hay BPC en el medio de cultivo.

No obstante, aun siendo conocido que Mn^{+2} actúa como mediador, inductor y/o sustrato de MnP (Cohen *et al.* 2002b), no se halló diferencia significativa en la producción de esta enzima cuando se agregaron 330 y 1,323 μM de Mn^{+2} al medio de cultivo. Sin embargo, otros estudios solo detectan actividad de MnP en un medio de glucosa y extracto de levadura complementado con $MnSO_4$ (270 μM) en cultivos sin contaminantes y actividad máxima después de 30 días (Kamitsuji *et al.* 2004).

Los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento de Lac son los esperados, pues se sabe que esta enzima tiene un pH óptimo que varía de 3 a 7 (Mayer y Staples 2002), en el presente estudio fue 6, además no requiere de una velocidad de agitación mayor de 100 rpm, pero la máxima producción de la enzima fue más tardía cuando hubo tóxico (20 días) que en ausencia de éste (12 días). Y en ausencia de los BPC se observó un efecto positivo de los cosustratos, probablemente ligado al balance C/N del medio de cultivo.

A pesar de que Lac de *P. ostreatus* sufre un fuerte incremento de la actividad en cultivos suplementados con 150 μM de Cu (Palmieri *et al.* 2003), en este trabajo no se observó tal efecto aplicando dos niveles de Cu (0.9 y 1.6 mM), ello sugiere la interacción de varios factores que impactan en la respuesta. Además hubo inducción de la actividad de esta enzima en presencia de los BPC con 3,500 mg/l de Tween 80 y 200 rpm, lo que de ello se intuye es que estos dos factores están relacionados directamente con la biodisponibilidad del tóxico. De esta manera se puede entender que las actividades Lac y VP podrían estar relacionadas con la remoción de los BPC bajo las condiciones de cultivo analizadas que aquí se presentan.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo a través del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (Cicyta), al Programa de Mejoramiento del Profesorado (Promep) y a Conacyt por la beca otorgada para realizar estudios de doctorado a Martha Gayosso Canales.

REFERENCIAS

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:255-260.
- Cohen, R., Persky, y Hadar, Y. 2002a. Biotechnological applications and potential of Word-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(5):582-594.
- Cohen, R., Persky, L., Hazan-Eitan, Z., Yarden, O. y Hadar Y. 2002b. Mn^{+2} alters peroxidase profiles and lignin degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* under different nutritional and growth conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103:415-429.
- Guillén-Navarro, G.K., Márquez- Rocha, F.J. y Sánchez-Vázquez, J.E. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:302-306

- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. y Kumahara, M. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:287-294.
- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. y Kumahara, M. 2005. Mn^{2+} is dispensable for the production of active MnP2 by *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 327:871-876.
- Keum, Y.S. y Li, Q. X. 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* 56:23-30.
- Lankinen, P., Hildén, K., Aro, N., Salkinoja-Salonen, M. y Hatakka, A. 2005. Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 401-407.
- Lú-Chau, T.A., Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Feijoo, G., Martínez, M.J., Lema, J.M. y Martínez, A.T. 2004. Effect of pH on the stability of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase during heterologous production in *Emmericella nidulans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* Online first 06 August.
- Mayer, A.M. y Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.* 60:551-565.
- Montgomery, D. C. 2003. *Diseño y análisis de experimentos*. Edit. Limusa.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microbial Technology.* 33:220-230.
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez M.J. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* 36:909-916.
- Rojas-Avelizapa, N.G., Rodríguez-Vázquez, R., Saval-Bohorquez, S. y Alvarez, P.J.J. 2000. Effect of C/N/P ratio and noionic surfactants on polychlorinated biphenyl biodegradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:319-324.
- Tinoco, R., Pickard, M.A. y Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 331-335.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H. 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267, 23688-23695.