



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL*

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“INDUCCIÓN DE LACASA Y SU EFECTO EN LA
REMOCIÓN DE ATRAZINA EN CO-CULTIVOS DE
HONGOS LIGNINOLÍTICOS Y MICROMICETOS”**

TESIS

Que Presenta

Q.F.B. MARÍA FERNANDA ROMO GARCÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

DIRECTORA

Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

ASESORES

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas

MÉXICO D.F.

OCTUBRE - 2015

I.- DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mis padres, porque más que por la satisfacción personal, lo hago para lograr que este mundo sea un lugar mejor para ustedes que forjaron los cimientos de mi desarrollo, a ustedes que destinaron su valioso tiempo para enseñarme nuevas cosas, para brindarme aportes invaluableles que servirán para toda la vida, darme la oportunidad de equivocarme y aprender, les agradezco infinitamente.

II.- AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

Primeramente agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría, sin la beca de esta institución no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto profesional y a mis asesores Dr. Luis Gilberto Torres y Dra. Ma. Del Cármen Montes; a mi directora Dra. Refugio Rodríguez por su acertada orientación y al Dr. Wilbert Chan por compartir sus conocimientos y antecedentes.

A mis compañeros de maestría Citlalli Cedillo, Sara Sánchez, Stephanie Hereira, Andrés Galeana, Laura Ortega, Enrique González, Leticia Romero, Anamarel Medina y Azuzena López por su invaluable apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Anlui Rodríguez, Dr. Hugo León y al M. en C. Roberto Zúñiga, por compartir conmigo las horas de trabajo en el laboratorio y hacer más amena mi estancia, por ayudarme a resolver los problemas técnicos, orientarme, su paciencia y su disponibilidad para escucharme, les quedo infinitamente agradecida.

A Sergio Domínguez por acompañarme en esta etapa importante de mi vida y defender este ideal mío tanto como si fuese suyo.

ÍNDICE

1.-RESUMEN.....	8
1.1.- ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	12
2.1- INTRODUCCIÓN.....	12
2.2.- CONTAMINACIÓN EN AGUA POR ATRAZINA.....	12
2.3.- BIORREMEDIACIÓN POR HONGOS Y BACTERIAS.....	15
2.4.- ENZIMAS FÚNGICAS.....	18
2.4.1.- LACASAS.....	18
2.4.2 LIGNINASAS.....	20
2.4.3.- PEROXIDASAS.....	21
3.- JUSTIFICACIÓN.....	24
3.1.- PROBLEMÁTICA DE CONTAMINACIÓN EN AGUA.....	24
3.2.- IMPORTANCIA Y VENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN FÚNGICA.....	28
3.3.-ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIORREMEDIACIÓN.....	29
4.- ANTECEDENTES.....	30
5.- HIPÓTESIS.....	34
6.- OBJETIVOS.....	34
6.1.- OBJETIVOS GENERALES.....	34
6.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
CAPÍTULO II.....	35
7.- SELECCIÓN DE CO-CULTIVOS.....	35
7.1 -METODOLOGÍA.....	35
7.2.-RESULTADOS.....	38
7.2.1 INTERACCIÓN EN CO-CULTIVOS.....	38
7.2.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	40
7.2.3.- REMOCIÓN DE ATRAZINA.....	43
CAPITULO III.....	45
8.- RESPUESTA FÚNGICA A LA PRESENCIA DE ATRAZINA.....	45
8.1-METODOLOGÍA.....	45
8.2.- RESULTADOS.....	47
8.2.1.- PORCENTAJE DE INHIBICIÓN Y E C.I. ₅₀	47

8.2.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	48
8.2.3.- CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA Y CO- CULTIVO.	50
CAPITULO IV	52
9.-OPTIMIZACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA ACTIVIDAD DE LACASA. .52	
9.1- METODOLOGÍA	52
9.1.1.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CONDICIONES “LIGNINOLÍTICAS” Y “NO LIGNINOLÍTICAS”.	52
9.1.2.- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA EN CO-CULTIVO.....	53
9.1.3.- ACTIVIDAD DE PROTEASAS.....	54
9.1.4 FORMACIÓN DEL INÓCULO	55
9.2.- RESULTADOS.....	56
9.2.1.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MEDIO CON CARACTERÍSTICAS “LIGNINOLÍTICAS” Y “NO LIGNINOLÍTICAS”.	56
9.2.2.- OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LACASA EN CO- CULTIVO	58
9.2.3.- ACTIVIDAD DE PROTEASAS.....	67
9.2.4.- FORMA DEL INÓCULO	69
CAPÍTULO IV	70
10.- REMOCIÓN DE ATRAZINA.....	70
10.1.- METODOLOGÍA.....	70
10.1.1.- REMOCIÓN CON EXTRACTO ENZIMÁTICO	70
10.1.2.- REMOCIÓN CON CONCENTRADO DE LACASA	73
10.1.3.- REMOCIÓN CON LACASA COMERCIAL	75
10.2.- RESULTADOS.....	76
10.2.1.- REMOCIÓN CON EXTRACTO ENZIMÁTICO	76
10.2.2.- REMOCIÓN CON CONCENTRADO DE LACASA	78
10.2.3.- REMOCIÓN CON LACASA COMERCIAL	81
11.- DISCUSIÓN	83
12.- CONCLUSIONES	90
13.- RECOMENDACIONES A FUTURO	91
14.- BIBLIOGRAFÍA	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.2.1- Vías de degradación de la atrazina.....	16
FIGURA 2.4.2.1- Catalytic cycle of laccase-catalyzed substrate oxidation.	19
FIGURA 2.4.3.1- Ciclo catalítico de lignina peroxidasa.....	22
FIGURA 2.4.3.2- Ciclo catalítico de manganeso peroxidasa.	23
FIGURA 4.1- Adsorción de atrazina.....	31
FIGURA 7.2.1- Tipos de interacción en co-cultivos.....	39
FIGURA 7.2.2.1- Actividad enzimática de lacasa.....	40
FIGURA 7.2.2.2- Actividad enzimática de MnP.....	41
FIGURA 7.2.3.1- Gráfico de remoción de atrazina.....	44
FIGURA 8.1.1- Estructura de cámara húmeda y sus componentes.....	46
FIGURA 8.2.2.1- Actividad enzimática de Lacasa en respuesta a Atrazina.....	49
FIGURA 8.2.3.1- Cambios morfológicos microscópicos.....	51
FIGURA 9.2.1.1- Actividad enzimática de lacasa de <i>T. maxima</i> en medio ligninolítico y no ligninolítico.....	57
FIGURA 9.2.2.1- Actividad de Lacasa en relación a proporción C:N	60
FIGURA 9.2.2.2- Gráfica de actividad específica de lacasa en corridas con respecto al tiempo.....	61
FIGURA 9.2.2.3-Actividad específica de MnP de <i>Trametes maxima</i> en co-cultivo correspondiente a las corridas del DCC.	63
FIGURA 9.2.2.4-Proteína total en co-cultivo de <i>T. maxima</i> y <i>P. carneus</i> correspondiente a las corridas del DCC.....	64
FIGURA 9.2.2.5- Resultados gráficos del diseño compuesto central.....	66
FIGURA 9.2.3.1-Análisis cualitativo de proteasas neutras y alcalinas después de 48hr..	68
FIGURA 10.1.1.1- Características físicas de atrazina.....	71
FIGURA 10.1.1.2-Cromatograma de metabolitos de atrazina.....	73
FIGURA 10.1.2.1-Gráfico de isoterma de Langmuir de q_e vs C_{d5}	78
FIGURA 10.2.2-Cromatogramas de atrazina extraída de concentrado de lacasa.....	79
FIGURA 10.2.2.2- Muestra analizada en HPLC con gradiente acetonitrilo-buffer para detección de metabolitos.....	80
FIGURA 10.2.3.1- Cromatograma de atrazina extraída de solución de lacasa comercial..	82

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1.1-Límites máximos permisibles en México de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos.....	13
TABLA 2.1.2.-Valores reportados de concentraciones de atrazina y sus productos de degradación en cuerpos de agua.....	14
TABLA 2.4.2.1-Comparación de potenciales redox E0' y la secuencia de aminoácidos de sitio t1 para oxidasas de diferentes fuentes.....	20
TABLA 3.1.1-Efectos biológicos de la atrazina.....	27
TABLA 4.1-Antecedentes de remoción de atrazina por basidiomicetos.....	33
TABLA 7.1.1-Escala de interacciones.....	36
TABLA 7.2.1-Resumen de interacciones entre micromicetos y Trametes maxima.....	38
TABLA 7.2.2.1-Incremento de actividad enzimática de lacasa.....	41
TABLA 7.2.2.2-Incremento en actividad enzimática de MnP.....	42
TABLA 8.2.1.1-Resultados de crecimiento en medio meo con atrazina.....	47
TABLA 8.2.2.1-Actividad de lacasa en medio con atrazina.....	48
TABLA 9.2.2.1-Matriz de DCC.....	59
TABLA 9.2.2.2-Desviaciones estándar determinadas con puntos centrales.....	62
TABLA: 9.2.2.3-Intervalos de confianza para valores de actividad de lacasa [U/mg] al 9° día.....	65
TABLA 10.1.2.1- Concentración de proteínas.....	74
TABLA 10.2.1.1- Remoción de atrazina con respecto al tiempo de incubación.....	76

1.-RESUMEN

La atrazina es un compuesto orgánico y uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial, su presencia en el ambiente es un aspecto de interés ambiental debido a que es un disruptor endócrino incluso a bajas concentraciones, aunque sus mecanismos de acción no han sido bien caracterizados. A pesar de que se indica que la atrazina debe ser utilizada bajo supervisión de personal capacitado es empleada rutinariamente para controlar malezas no deseadas tanto terrestres como acuáticas, incluso se usa conjuntamente con otros herbicidas. Los efectos disruptores de la atrazina se manifiestan principalmente mediante alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, ya que impide la liberación de prohormonas del hipotálamo alterando los niveles de hormonas sexuales en la sangre. La atrazina puede ingresar al organismo por distintas vías, por ejemplo nasal, dérmica u oral; por esta última vía se manifiestan efectos adversos a dosis bajas, además de que provoca hepatotoxicidad leve. La manera mediante la cual se puede incorporar la atrazina es mediante el consumo de agua contaminada por este herbicida en concentraciones que excedan el límite de 0.003 mg/L (ó 3 ppb) establecido por la USEPA.

Una de las alternativas propuestas para la remoción de atrazina es por medio de enzimas ligninolíticas, las cuales en comparación con otras enzimas extracelulares tienen una mayor capacidad para degradar este tipo de compuestos debido a su poca especificidad y a los altos potenciales redox de 420 a 790mV. Sin embargo el principal obstáculo para la biodegradación con enzimas, es el hecho de que la producción por microorganismos no suele ser suficiente para degradar altas concentraciones de dichos compuestos xenobióticos, por lo que una de las soluciones propuestas es el aumento de la actividad enzimática mediante la inducción con co-cultivos, basándose en los antecedentes existentes del equipo de trabajo que soportan la teoría de que al confrontar micromicetos contra basidiomicetos de la pudrición blanca se forman co-cultivos, condición en que la actividad de enzimas extracelulares presenta aumentos significativos, por citar un ejemplo, actividades de 1114 U/L de MnP y 54690 U/L de lacasa en co-cultivo del micromiceto *Paecilomyces carneus* con el basidiomiceto *Trametes maxima*, un incremento de 5.2 veces con respecto al monocultivo de *T. maxima* [Chan-Cupul, 2013].

El presente trabajo tuvo como objetivo comprobar el papel de la lacasa del hongo basidiomiceto *Trametes maxima* en la degradación o remoción de atrazina puesto que actualmente no existen reportes bibliográficos que lo comprueben. Con el fin de que la lacasa no fuese el factor limitante para la remoción, se indujo un aumento en la actividad enzimática de lacasa mediante co-cultivos con micromicetos, que es una herramienta ecológica potencial, debido a que a diferencia de otros métodos para aumentar la actividad enzimática no requiere de inductores químicos ni modificaciones genéticas. En co-cultivo la actividad enzimática de *T. maxima* tuvo un incremento de 9.35 veces en comparación con el control en monocultivo. En cuanto a la atrazina se obtuvo una remoción de hasta 53.26%, sin embargo no se comprobó que la lacasa fuera la enzima responsable de este proceso, por lo que dicha remoción se atribuyó a otras proteínas extracelulares de *T. maxima* capaces de formar aductos con la atrazina. La disminución en la concentración del herbicida no se debió a la degradación, ya que no se detectaron metabolitos de atrazina.

1.1.- ABSTRACT

The atrazine is an organic compound and one of the most widely used worldwide herbicides, the presence in the environment is an issue of environmental concern because this herbicide is an endocrine disruptor even at low concentrations, but their action mechanisms have not been yet well characterized. Despite stating that atrazine should be used under the supervision of trained staff is used routinely to control unwanted terrestrial and aquatic weed, it is even used in conjunction with other herbicides. The disruptive effects of atrazine are mainly manifested by alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as it impede the release of pro-hormones of the hypothalamus, altering the levels of reproductive hormones in blood. Atrazine can enter the body by different ways, for nasal, dermal or oral via example, by this via the adverse effects can occur at low doses besides cause mild hepatotoxicity. The way in which atrazine can be incorporated is by consuming water contaminated by this herbicide in concentrations exceeding the limit of 0.003 mg / L (or 3 ppb) seted by the USEPA.

One of the proposed alternative for the removal of atrazine is through biodegradation by ligninolytic enzymes, which compared to other extracellular enzymes have a greater capacity for degrading these kind of compounds due to their poor specificity and high redox potential, ranging from 420 to 790mV. However the main obstacle for the enzymatic bioremediation is the fact that the production by microorganisms generally is not enough and thus, unable to degrade xenobiotics at high concentrations, so as a solution would be an increased enzymatic activity by induction with co-cultures, based on the existing record in the work team that supports the theory that when confronted microfungi against white rot Basidiomycetes, co-cultures are formed, condition in wich the activity of extracellular enzymes presented significant increases, to cite one example, activities have reached 1114 UL⁻¹ of MnP and 54690 UL⁻¹ of laccase in co-culture of *Paecilomyces carneus* with basidiomycete *Trametes maxima*, a 5.2 fold compares to monoculture of *T. maxima* [Chan-Cupul, 2013].

This paper aims to test the role of fungus basidiomycete *Trametes maxima* laccase in removing atrazine since degradation of this herbicide by laccase has not been yet proved. In order to avoid that the laccase enzyme be the removal limiting factor, an increase in the enzymatic activity of laccase was induced by co-cultures with microfungi, which it is a potential ecological tool because, unlike other methods for increasing the enzymatic activity does not require genetic modification or chemical inducers. As for atrazine, one was obtained a removal of 53.26 %, however it was not proven that the laccase was the enzyme responsible for this process, so that removal was attributed to other *T. maxima*'s extracellular proteins capable to form adducts with atrazine. The decrease in herbicide concentration was not due to degradation, because no atrazine metabolites were detected.

CAPÍTULO I

2.1- INTRODUCCIÓN

2.2.- CONTAMINACIÓN EN AGUA POR ATRAZINA

La Atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)1,3,5-triazina-2,4-diamina) pertenece al grupo de los herbicidas triazínicos organoclorados; es un herbicida selectivo que se aplica al suelo siendo absorbido por las raíces o las hojas de las hierbas, para controlar la aparición de malezas en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar, trigo y varios tipos de pastos aunque su uso se extiende también a la aplicación en lagos para controlar el crecimiento de maleza acuática. El herbicida se comenzó a comercializar en 1958 a nivel mundial y en México en 1975 [SAGARPA, 2007], pero a pesar de los estudios realizados en 1995 que demostraron que este herbicida tiene actividad biológica de tipo disruptora [ATSDR, 2003] actualmente se sigue usando en dosis promedio de 0.1 a 4 kg/ha/año [Villada-Canela, 2006].

A pesar de la problemática existente, inicialmente no había normatividad alguna que restringiera el uso de este herbicida y fue hasta el año 2006, cuando por respaldo de la USEPA se decretaron los límites seguros máximos permisibles para la atrazina, la cual no debe exceder concentraciones mayores a 0.003 mg/L o 3 ppb en agua [USEPA, 2006] mientras que a nivel nacional el proyecto “agua para uso y consumo humano: Límites máximos permisibles de la calidad de agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento” (ANEAS) estableció que la concentración máxima permisible de atrazina en agua debe de ser menor a 2 µg/L [ANEAS, 2007] (TABLA 2.1.1).

TABLA 2.1.1	
LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES EN MÉXICO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS HALOGENADOS ADSORBIBLES FIJOS [ANEAS 2007].	
Parámetros	Límite Máximo Permissible (µg/L)
COMPUESTOS ORGÁNICOS SEMIVOLÁTILES	
Hexaclorobutadieno	0.60
Pentaclorofenol	9.00
2,4,6 Triclorofenol	2.00
PLAGUICIDAS CLORADOS	
Alacloro	20.00
Aldrín	0.03
Atrazina	2.00
Clordano (total de isómeros)	0.20
Cianazina	0.60
DDT y metabolitos	1.00

Debido a lo tardío del establecimiento de normas de regulación en México, actualmente se han llegado a reportar concentraciones de atrazina de 6.23 a 21.26 µg/L en cuerpos de agua subterráneos y de 4.62 a 15.01 µg/L (TABLA 2.1.2) en cuerpos de agua superficiales [Hernández, 2011].

Sin embargo la degradación de este herbicida ha sido motivo de estudio desde 1995, debido a que se han diseñado y probado varios métodos que permitan la degradación de atrazina sin la consecuente producción de metabolitos más tóxicos. Puesto que se ha determinado que los procesos naturales mediante los cuales se elimina este herbicida suelen ser muy poco predecibles y controlables, por ejemplo, dependiendo de las condiciones del suelo, la vida media de la atrazina puede variar desde 35 días [Guillén-Garcés, 2007] hasta 5 años [González-Márquez, 2009].

TABLA 2.1.2.

VALORES REPORTADOS DE CONCENTRACIONES DE ATRAZINA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN CUERPOS DE AGUA [Hernández, 2011].

Cuerpo de agua	Lugar	(µg/L)	Referencia
Subterráneo	Estados Unidos de América	0.1-88	Readman y col. (1993), Champman y Stranger (1992)
Subterráneo	Big Springs, EUA	2.5-10	Ritter y col (1996)
Subterráneo	Cuenca del río Baiyangdian, China	0.4-3.29	Ye y col (2001)
Subterráneo	Provincia de Vojvodina, Serbia	0.198	Pucarević y col. (2002)
Subterráneo	Franja de Gaza, Oriente Próximo	3.5	Shomar y col. (2006)
Subterráneo	Kentucky, EUA	0.14-0.46	Golla y col. (2011)
Subterráneo	Provincia de Jilin, China	0.107	Geng y col. (2013)
Subterráneo	Estambul y Dardanelos, Turquía	0.031-0.041	Nödler y col (2013)
Subterráneo	Zona Agrícola de referencia , México	6.23-21.26	Hernández-Antonio y Hansen (2011)
Superficial	Zona Agrícola de Referencia, México	4.62-15.01	Hernández-Antonio y Hansen (2011)
Superficial	Laguna Costera, Norte Adriático, Italia	2.4-8.2	Carafa y col. (2007)

Aunado a los problemas de recalcitrancia de este herbicida la degradación también puede ser un inconveniente debido a que algunas rutas de degradación producen metabolitos más persistentes que la atrazina, por ejemplo, los metabolitos más comunes son la hidroxiatrazina (HA), dietilatrazina (DEA), disopropilatrazina (DIA), didealquilatrazina (DDA) y dietilhidroxiatrazina (DEHA); los metabolitos dietilatrazina (DEA), di-isopropilatrazina (DIA), diaminoclorotiazina (DACT) y didealquilatrazina (DDA) tienen una toxicidad similar a la de la atrazina y presentan un riesgo para la salud humana [ATSDR, 2003], mientras que DIA, DEA, DDA (producto de la biodegradación), HA y DEHA (formados por reacciones químicas o biodegradación) carecen de actividad biológica [Adams, 1991].

Por lo anterior se establece que un proceso más que eficaz, eficiente para la degradación de atrazina no debe de inhibirse por la concentración de nitrógeno en el medio y además debe de mineralizar la atrazina, al grado en el que no se presenten metabolitos como DEA, DIA, DACT o DDA.

2.3.- BIORREMEDIACIÓN POR HONGOS Y BACTERIAS

La Atrazina es un herbicida candidato para ser mineralizado por biodegradación, debido a que aunque se han diseñado métodos para la eliminación de atrazina de los cuerpos de agua con base en procesos químicos o físicos como la adsorción por carbón activado [Cabral-Coelho, 2012] los métodos biológicos son los que parecen mostrar resultados más favorables debido a que la atrazina puede ser usada por los microorganismos como fuente de nitrógeno y carbono, incluso hay reportes de que actúa como intermediario para la degradación de otros xenobióticos al ser usada como una fuente de nutrientes por la microbiota, por ejemplo, la degradación biológica de alacloro no comienza hasta que la atrazina ha sido degradada un 15% cuando estos 2 herbicidas se encuentran en suelo [Chirnside, 2007].

La Atrazina es biodegradada y mineralizada tanto por hongos como por bacterias, pero existen diferencias marcadas en el proceso de biodegradación como en los factores determinantes que influyen en este proceso. La biodegradación por bacterias se realiza mediante la activación de genes inducibles que codifican a varias enzimas especializadas (FIGURA 2.2.1), la más común es la Atz, la cual cataliza la reacción de dechloración de la atrazina [Reátegui, 2012], pero al ser inducible la expresión de este gen se ve afectada por la presencia de fuentes más accesibles de nitrógeno que la atrazina, disminuyendo o anulando la degradación del herbicida. Por otra parte las enzimas extracelulares de basidiomicetos son incapaces de biodegradar la atrazina mediante dechloración, pero en cambio, la producción de enzimas ligninolíticas de estos hongos es constitutiva además de que se incrementa en respuesta a la disminución de nitrógeno y fuente de carbono por lo que los basidiomicetos no necesitan ser adaptados [Barr, 1992].

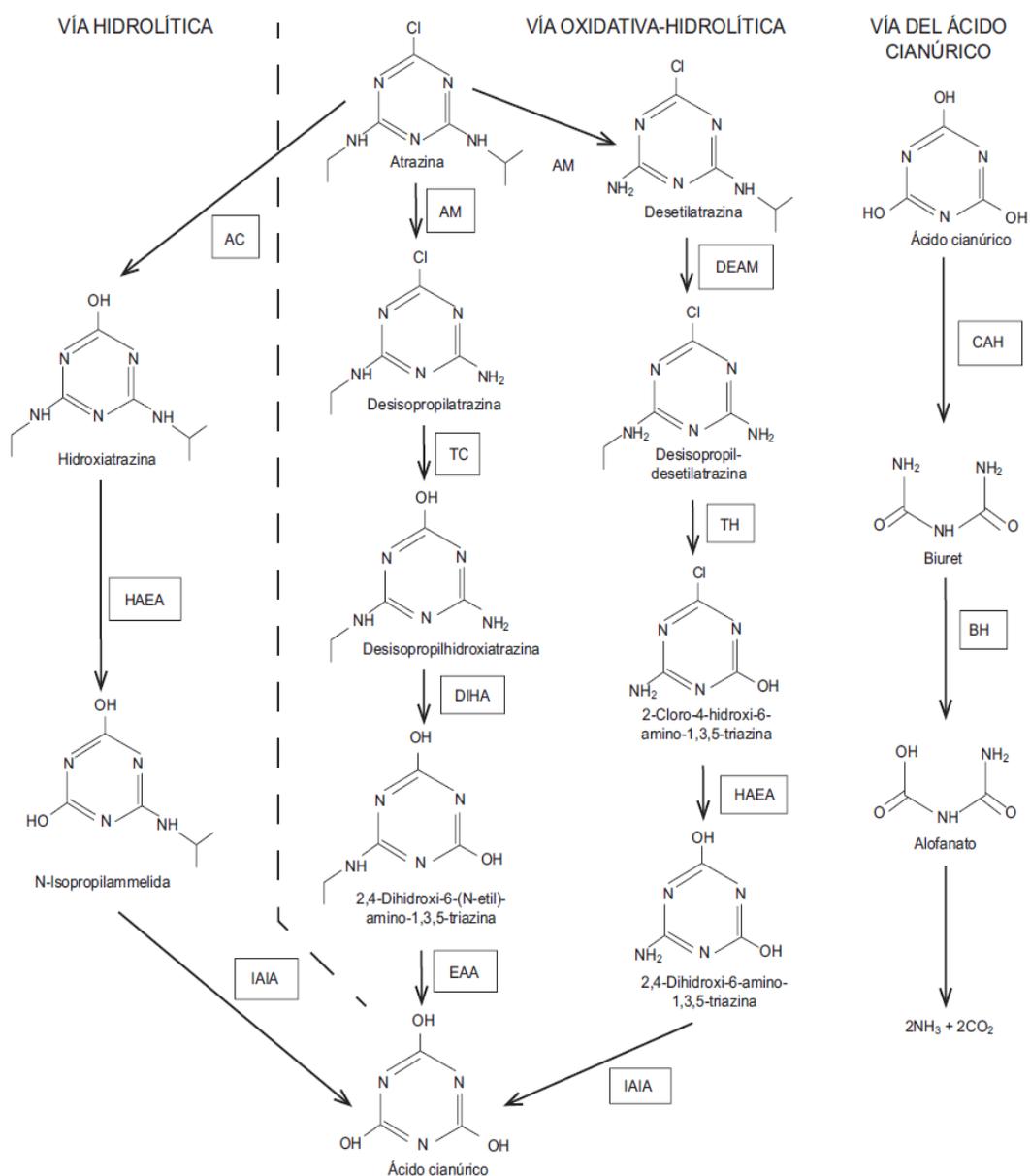


FIGURA 2.2.1: VÍAS DE DEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA. Degradación hasta su intermediario ácido cianúrico, se muestran las enzimas participantes, AC atrazina-clorohidrolasa, HAEA hidroxiatrazina etilaminohidrolasa IAIA N-isopropilammelida isopropilamidohidrolasa, AM atrazina monooxigenasa Tc s.triazina clorohidrolasa, DEAM desetilatrazina monooxigenasa DiHA desisopropilhidroxiatrazina amidohidrolasa, EAA N-etilammelida amidohidrolasa TH s-triazina hidrolasa CAH ácido cianúrico hidrolasa , BH biuret hidrolasa AH alofanato hidrolasa [Govantes, 2009]

Otra ventaja que presentan los hongos sobre las bacterias en materia de biodegradación de la atrazina es el hecho de que aunque los 2 producen lacasa, las lacasas fúngicas poseen potenciales redox más altos, de 0.7 a 0.8 V, mientras que en las bacterias es de 0.4 a 0.5 V [Bourbonnais, 1880].

Además la diferencia de los hongos respecto a las bacterias es que tienen un espectro más amplio además de la baja especificidad del citocromo P-450, el cual es capaz de degradar varios compuestos xenobióticos [Sariaslani, 1991]. Esta capacidad de degradación por parte del citocromo P-450 se debe a que existe una gran variabilidad genética para P-450, por ejemplo *Phanerochaete chrysosporium* tiene al menos 97 genes que codifican para P-450s, además de que los hongos son capaces de aumentar la producción de P-450 en condiciones no ligninolíticas [Ichinose, 2002]. Los hongos poseen mecanismos intracelulares de degradación de contaminantes vía reductiva y oxidativa que les permiten tolerar mayores concentraciones de xenobióticos en el medio [Rodakiewicz-Nowak, 2000].

Tanto la tolerancia a altas concentraciones de compuestos xenobióticos como la actividad degradadora de los hongos se sinergiza al utilizar co-cultivos en lugar de cultivos axénicos, por ejemplo, se ha demostrado que en co-cultivos de *Phanerochaete ostreatus* y *Ceriporiopsis subvermispora* incrementa significativamente ($p=0.01$) la producción de enzimas ligninolíticas en comparación con su expresión en monocultivos esta actividad enzimática se ha mantenido incluso después de ser extraída del micelio, además se demostró que se expresaron isoformas diferentes de estas enzimas sólo en el co-cultivo [Chi Yujie, 2007].

2.4.- ENZIMAS FÚNGICAS

Generalmente se relaciona la capacidad de degradación de los hongos de pudrición blanca con la actividad de su sistema enzimático ligninolítico, sin embargo, en numerosos trabajos se ha comprobado que estos hongos degradan xenobióticos incluso bajo condiciones de cultivo no ligninolíticas, ya que muchos de ellos no son degradados por las enzimas ligninolíticas en condiciones *in vitro*, sino que son degradados por radicales producidos por las mismas enzimas al hidrolizar sustratos específicos.

El “sistema de degradación de lignina” (SDL) es el sistema catabólico más importante de degradación de xenobióticos propio de los hongos de pudrición blanca. Este sistema enzimático está integrado por lignino peroxidadas (LiPs), manganeso peroxidadas (MnP), un grupo de enzimas productoras de H₂O₂ como la glioxal oxidasa, aryl alcohol oxidasa, entre otras y un grupo de oxidadas (lacasas) [Hofrichter, 2002]. El segundo sistema catabólico más importante es también oxidativo, en el que intervienen las enzimas citocromo P-450 y monooxigenasas; varios de los metabolitos producidos por las reacciones de este mecanismo incluyen fenoles, epóxidos, dihidrodioles y quinonas. El tercer mecanismo es reductivo, en el cual un conjunto de enzimas cataliza reacciones de conjugación con sulfato, ácido glucorónico, glutatión, u otras moléculas [Quintero- Díaz, 2011].

2.4.1.- LACASAS

Las lacasas (bencendiol:oxígeno oxidorreductasa, E.C. 1.10.3.2) son glicoproteínas extracelulares que poseen cuatro átomos de cobre distribuidos en tres sitios de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas. El sitio 1 contiene el átomo de cobre que reacciona dándole la coloración azul a la enzima, este átomo coordina con una cisteína. En el sitio 2 está un sólo átomo de cobre y en el sitio 3 están los 2 átomos de cobre restantes Cu^{3a} y Cu^{3b}, que están fuertemente apareados [Christian, 2003].

No todas las lacasas contienen el Cu^3 en el sitio 1, al cual se debe la coloración azul como en el caso de *Pleurotus ostreatus* [Gianfreda, 1999], este átomo de cobre en el sitio 1 puede ser accionado por disolventes, incluyendo el agua y pueden ser removidos de la enzima por varios complejos, su inestabilidad se debe a que no está unido a metionina, este principio es característico de todas las lacasas fúngicas [Roalski, 2004]. Las lacasas pueden formar estructuras diméricas o poliméricas, en SDS-PAGE la mayoría de las lacasas corresponden a un peso molecular de 50 a 110 *kDa* y son enzimas altamente glicosiladas (30-45%) por manosa principalmente lo que les confiere termoestabilidad incluso hasta los 70°C [Bourbonnais, 1880]. Sus valores de *K_m* están en el rango de 1-10 *mM* y el $\log(K_{cat}/K_m)$ incrementa proporcionalmente con el potencial *redox* [Wong, 2009]. Las lacasas fúngicas suelen tener puntos isoeléctricos (p.I.) de 3 a 7 y su pH óptimo es de 3.5 a 5.2 dependiendo de la isoenzima.

La función en la naturaleza de la lacasa es de remover fenoles del medio que puedan resultar tóxicos para los hongos, por ello catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos, polifenólicos, aminas aromáticas y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina [Mikolash, 2009] (FIGURA 2.4.2.1); esta oxidación se da mediante la remoción de un electrón y un protón de los hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y amino seguida de polimerización de los compuestos oxidados o dimetilación; en este proceso el oxígeno molecular es el aceptor de electrones [Rodakiewicz-Nowak, 2000].

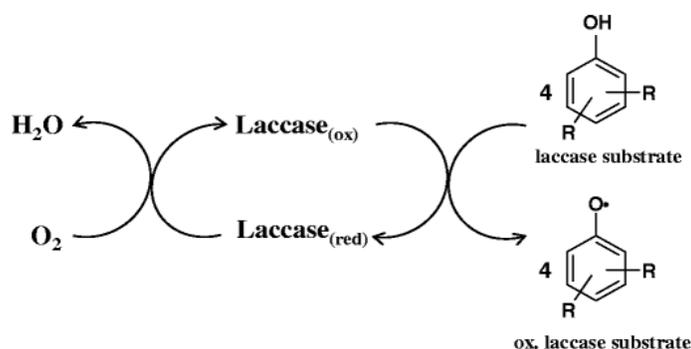


FIGURA 2.4.2.1: CATALYTIC CYCLE OF LACCASE-CATALYZED SUBSTRATE OXIDATION. [Mokolash 2009]

La lacasa es producida tanto por basidiomicetos, ascomicetos, deuteromicetos, plantas y bacterias, aunque su función natural puede ser dirigida hacia el catabolismo o en anabolismo. Las Lacasas con mayor potencial redox, son las producidas por los basidiomicetos, y de estos el género *Trametes sp.* es el que produce lacasas con el mayor potencial redox (TABLA 2.4.2.1) [Shleve , 2004].

TABLA 2.4.2.1		
COMPARACIÓN DE POTENCIALES REDOX E ⁰ Y LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SITIO T1 PARA OXIDASAS DE DIFERENTES FUENTES [Shleve, 2004]		
Oxidasa	Secuencia	E ⁰ T1 (mV)
<i>Trametes hirsuta</i>	GHSFL... <u>H</u> ...H <u>C</u> HIDFH <u>L</u> LEAG <u>E</u>	780
<i>Trametes versicolor</i>	GNSFL...H...HCHIDFHLEAGF	780
<i>Trametes villosa (pinsutus)</i>	GHSFL...H...HCHIDFHLEAGF	780
<i>Rhizoctonia solani</i>	GPAFV...H...HCHIDFHLEAGL	710
<i>Coprinus cinereus</i>	GHAFL...H...HCHIDFHLMNGL	550
<i>Rhus vernificera</i>	GTNFI...H...HCHFERHTTEGM	430
<i>Zucchini ascorbate oxidase</i>	GETFF...H...HCHIEPHLMGM	340

2.4.2 LIGNINASAS

La lignina no es un polímero simétricamente ordenado, por lo tanto no es lógico atribuir la degradación de este compuesto a una sola enzima que tenga la capacidad de despolimerizar una estructura tan irregular, por ello para degradar la lignina los hongos tienen la capacidad de producir varias enzimas, lo cual significa un alto gasto energético. Los hongos son incapaces de sobrevivir en medios donde la lignina es la única fuente de carbono, además del hecho de que la lignina tiene un valor calorífico muy bajo, por esto los hongos degradan la lignina sólo para acceder a la celulosa que está localizada al interior dentro de las paredes celulares [Kirk, 1976].

La poca especificidad de las ligninasas da la pauta para que su uso principal sea en la producción de radicales libres los cuales son capaces de reaccionar con un amplio rango de moléculas orgánicas. Las peroxidasas dependientes de H_2O_2 y las lacasas dependientes de oxígeno molecular son las enzimas responsables del ataque a la lignina [Evans, 2001]. Se ha demostrado que el mecanismo oxidativo de las enzimas ligninolíticas, cataliza la degradación de gran cantidad de xenobióticos incluyendo hidrocarburos poliaromáticos, cloroaromáticos, dioxinas, tintes, entre otros que presenten potenciales de ionización $(PI) \leq 7.55 \text{ eV}$ [Christian, 2005][Collins, 1996].

2.4.3.- PEROXIDASAS

Las peroxidasas *in vitro* pueden ser estimuladas por estrés de nitrógeno, algunas peroxidasas como LiP tienen un aumento en su actividad cuando están en contacto con alcohol veratrílico, el cual es un metabolito secundario producido por varios hongos de pudrición blanca [Evans, 2001]. La principal de las peroxidasas es la ligninaperoxidasa (LiP), que está catalogada como una proteína altamente glicosilada. Sin embargo no es producida por todas las especies de hongos de pudrición blanca [Chi, 2007] incluso se reporta que MnP es más común que LiP [Rodakiewicz-Nowak, 2000]; esta enzima se distingue por su capacidad de oxidar sustituyentes metoxi en anillos aromáticos no fenólicos por los radicales catiónicos generados.

La lignina peroxidasa actúa en conjunto con otros oxidantes que pueden penetrar las células de la madera, de esta manera la degradación de la lignina comienza con la extracción de un electrón del sustrato aromático produciendo arilos aromáticos. La Lip es oxidada por peróxido a un intermediario deficiente de dos electrones que regresa a su estado inicial tomando un electrón del sustrato donador, las Lip son las peroxidasas más potentes puesto que oxidan compuestos no fenólicos (FIGURA 2.4.3.1).

El pH óptimo para LiP es por debajo de 3 aunque la enzima muestra inestabilidad si se mantiene en un ambiente con este pH [Ollikka, 1993]. La LiP puede ejercer por sí misma la acción oxidativa o formar radicales libres a partir de algunos compuestos orgánicos como el alcohol veratrílico (AV) o el dimetoxibenceno (DMB) de manera análoga a como ocurre con las MnP. Estos radicales libres, son sustancias altamente oxidantes que pueden difundirse y penetrar en matrices en las que las propias enzimas MnP y LiP no pueden acceder y así aumentar la biodisponibilidad de sustratos y xenobióticos [Cameron, 2000].

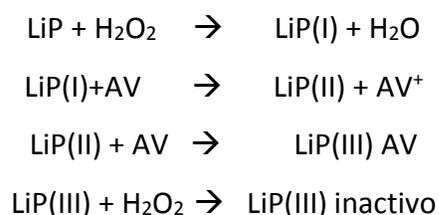


FIGURA 2.4.3.1: CICLO CATALÍTICO DE LIGNINA PEROXIDASA. [Quintero-Díaz, 2011]

La Manganese peroxidase (MnP) participa en la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , usando H_2O_2 como oxidante (FIGURA 2.4.3.2), el primer sustrato reducido en el ciclo catalítico de MnP es Mn^{2+} ; posteriormente el Mn^{2+} reduce ambos estados de la enzima, MnPI y MnPII, generando Mn^{3+} , el que oxida al sustrato orgánico [Paszczynski, 1992], el Mn^{3+} se estabiliza formando quelatos con ácidos carboxílicos (por ejemplo los ácidos oxálico, malónico, málico, tartárico, láctico) que actúan como mediadores difusibles de baja masa molecular eliminando electrones e hidrógenos inespecíficamente a moléculas orgánicas [Hofrichter, 2002], esta unión es necesaria puesto que el Mn^{3+} es un oxidante débil, de hecho es poco probable que tenga el potencial necesario para oxidar moléculas recalcitrantes, sin embargo, se ha reportado que oxida moléculas fenólicas [Rodakiewicz-Nowak, 2000].

Ciertos co-oxidantes como son compuestos orgánicos sulfurados (Glutación, L-cistelna, etc.) y ácidos grasos insaturados (Ácido linoléico, Tween 80, etc.) son oxidados por el sistema de las MnP para formar radicales tiol y peroxi altamente reactivos, los cuales pueden atacar compuestos recalcitrantes que normalmente no son atacados directamente por las MnP, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos de entre tres y seis anillos [Hofrichter, 2002].

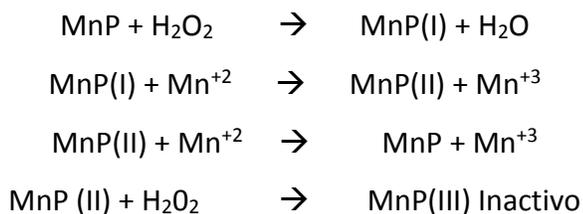


FIGURA 2.4.3.2: CICLO CATALÍTICO DE MANGANESO PEROXIDASA.
[Quintero-Diaz, 2011]

3.- JUSTIFICACIÓN

3.1.- PROBLEMÁTICA DE CONTAMINACIÓN EN AGUA

La atrazina es una triazina con actividad herbicida que actúa por vía radical traslocándose en sentido acrópeto por el xilema acumulándose en los meristemos apicales y en hojas e impidiendo la fotosíntesis interfiriendo en la fase de absorción del CO₂ así como otros procesos enzimáticos.

Su mecanismo de acción consiste en una unión competitiva con la plastoquinona para enlazarse a la proteína Q_B en el fotosistema II, esta asociación interfiere en los procesos relacionados con los procesos de germinación pero debido a la interferencia con el proceso de la fotosíntesis la atrazina reprime el metabolismo de la hierba después de ser absorbida [Gorge, 1999]. Las plantas tolerantes la metabolizan rápidamente de la atrazina a hidroxiatrazina o conjugados aminoácidos, los cuales posteriormente también se metabolizan a hidroxiatrazina por la degradación de las cadenas laterales e hidrólisis de los aminoácidos resultantes en el anillo [Marcacci, 2005].

Generalmente la atrazina suele aplicarse en preemergencia y postemergencia y no es recomendable utilizar este herbicida en suelos arenosos ni en cultivos que estén próximos a árboles o arbustos cuyas raíces puedan alcanzar el suelo del cultivo tratado, debido a que puede ser fitotóxica para muchos cultivos como el cacahuate, cereales, espárrago, jitomate, papa, remolacha, soya, tabaco y la mayoría de los cultivos hortícolas [Villada-Canela, 2006]. En la práctica, con el fin de elevar la eficiencia herbicida de la atrazina, esta se emplea en conjunto con otros herbicidas, por ejemplo con acetoclor y simazina en los cultivos de maíz, con ametrina en cultivos de caña de azúcar y con terbutrina en cultivos de sorgo; estas combinaciones permiten mejorar la distribución de la atrazina en suelo y plantas.

Por ejemplo el acetoclor es un herbicida alcalino mientras que la atrazina es un herbicida ácido, por lo que al usarse simultáneamente, el acetoclor se adsorbe más que la atrazina en la materia orgánica y minerales cargados negativamente causando así una distribución homogénea de la atrazina pero también una mayor migración de la atrazina a los cuerpos de agua [Ware, 2000]. A consecuencia de estas prácticas la concentración de atrazina en agua ha superado los límites permisibles y aunado a este inconveniente la concentración de atrazina en agua superficial no siempre es un indicador exacto de las condiciones de contaminación, debido a que la concentración de atrazina disuelta en agua puede ser menor que la que se encuentra en los sedimentos del cuerpo acuático, por ejemplo se han reportado concentraciones 1-100 veces mayores en sedimento que en agua; esta diferencia entre la distribución en el agua superficial y el agua cercana al sedimento se debe a la materia orgánica e inorgánica disuelta como SOC (Carbón orgánico suspendido) [On-Anong, 2008]. No sólo la cantidad de materia orgánica determina la distribución de atrazina, también los factores climáticos influyen directamente en la dinámica del herbicida, por ejemplo después de la aplicación de la atrazina en suelos los eventos de lluvia favorecen el transporte del herbicida por escurrimiento, mientras que las lluvias continuas causan la infiltración y con lluvias débiles (menores de 2 mm/h) la disipación de atrazina. Esta última situación es en la que la mayor cantidad de atrazina se degrada antes de llegar al manto freático [Correia, 2007].

Por lo anterior en suelos con atrazina se recomienda cero o mínima labranza para así favorecer la oxidación lenta y la sorción de atrazina a la materia orgánica. Por el contrario, la disminución de materia orgánica provoca la disolución de la atrazina y esto aumenta el riesgo de migración del herbicida hacia los cuerpos de agua [Montoya, 2006] incluso a 300 km del área en donde se aplicó [ATSDR, 2003]. La distribución de la atrazina tanto en suelo como en agua depende de la fracción que interactúe con la molécula y de sus propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad ($\log P_{ow}$).

La fracción disuelta de la atrazina suele ser reducida por asociación con compuestos y/o bioacumulada por lo que para que pueda eliminarse por degradación abiótica mediante reacciones redox, hidrólisis o fotólisis deben de existir condiciones con factores adecuados como el pH, la concentración de materia disuelta y la temperatura [Katagi, 2006].

En México hay varias zonas contaminadas con atrazina por lo que es común que parte de la población esté expuesta a este herbicida y pese a lo anterior si bien se sabe que la atrazina es un disruptor endócrino no han sido esclarecidos los síntomas de intoxicación en humanos debido dos principales factores, el primero consiste en que los individuos demuestran diferentes sintomatologías en relación con la dosis a la que han sido expuestos y el segundo es debido a la difícil extrapolación a humanos de los resultados de estudios hechos en animales porque los mecanismos de patogenicidad varía según el género y la especie evaluada [Tabla 3.1.1]. Por ejemplo, la atrazina en ratas Sprague-Dawley interrumpe el eje hormonal hipotálamo-hipófisis-gónadas puesto que a nivel hipotálamo interfiere con la capacidad de este para liberar gonadotropina (GnRH) necesaria para estimular a la hipófisis a liberar hormona luteinizante (LH); sin suficiente LH la ovulación no ocurre y los niveles de estrógenos permanecen altos.

Además los niveles de prolactina aumentan en la hipófisis y decrecen en suero [Šimić, 1994] [Cummings, 2000] mientras que en otras especies de ratas y en cerdos la exposición a la atrazina incrementa los niveles de progesterona. Los efectos menos adversos con dosis bajas (LOAEL) se manifiestan con una dosis de 1mg/kg/d mientras que una dosis de 25mg/kg/d es suficiente para irrumpir en el eje del sistema endócrino [Ćurić , 1999].

TABLA 3.1.1

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA ATRAZINA			
Referencia	Dosis (mg/kg/d)	Efecto	Sujeto
EPA: 1984, 1987, 1987	25mg	Pérdida de peso	Rata
EPA 1987	247mg	Incremento de trombina, dilatación atrial, atrofia	Ratón
	34 mg	Incremento de trombina, dilatación atrial, atrofia	Perro
EPA: 1984, 1987	52mg	Alteración en parámetros químicos de hígado y riñón	Rata
EPA: 1987	71 mg	Alteraciones hematológicas	Rata
	194 mg	Alteraciones hematológicas	Ratón
	34 mg	Alteraciones hematológicas	Perro

Aunque la atrazina no tiene potencial teratogénico, se han reportado en estudios con ratas y conejos en los cuales la ingestión de este herbicida provoca pérdidas post-implantación del producto, resorciones, decremento en el tamaño de la camada y de los fetos así como osificación incompleta, mientras que en machos eleva los niveles de mieloperoxidasa en próstata con la consecuente inflamación de este órgano. Por los efectos que provoca la atrazina se clasifica en el grupo C según la clasificación de la EPA, puesto que se cuenta con evidencia limitada de que la atrazina sea carcinógena y no existen datos en humanos que lo comprueben [Felsot, 2013].

La atrazina no afecta sólo a la producción de hormonas y al funcionamiento de las glándulas sexuales, también afecta a otros órganos, por ejemplo, en cerdos se ha demostrado que afecta también al hígado con una administración de 2mg/kg/d de atrazina durante 19 días, puesto que se detecta un aumento de un 350% en la actividad de γ -glutamilttransferasa y promueve la infiltración de linfocitos y eosinófilos mientras que el daño renal por atrazina ha sido observado en ratas y cerdos, aunque no en ratones o perros. Para el caso de las ratas con una administración de 52mg/kg/día durante 1 año se produjo una reducción en el tamaño del riñón e incremento del volumen de orina y la incidencia de cálculos [Ćurić, 1999].

3.2.- IMPORTANCIA Y VENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN FÚNGICA

Existen diferentes alternativas para el tratamiento de residuos contaminados con COPs (contaminantes orgánicos persistentes) siendo las más usadas las tecnologías físico-químicas como la incineración, la desorción térmica y la oxidación fotocatalítica, sin embargo, recientemente se ha hecho énfasis en el desarrollo y la aplicación de tecnologías de remediación sustentable denominadas tecnologías de biorremediación debido a que en comparación con los tratamientos físico-químicos los métodos de biorremediación son menos costosos e invasivos. Por ejemplo, los tratamientos *ex-situ* de suelos contaminados tienen un costo promedio de 170 euros/m³, con relación a tratamientos de disposición en rellenos, lixiviación o térmicos, que oscilan entre 200 y 300 euros/m³ [Summersgill, 2005].

Las razones que motivan a utilizar a los microorganismos como alternativa para la degradación de herbicidas y plaguicidas se basan en el hecho de que los microorganismos son capaces de utilizar a los contaminantes como fuente de nutrientes, aunque requieren de una previa adaptación al medio y a concentraciones de los xenobióticos que se busca degradar, de hecho la biorremediación puede limitarse debido a la presencia de plaguicidas, fertilizantes y otros compuestos orgánicos que elevan drásticamente los niveles de contaminación inhibiendo el crecimiento de los microorganismos endémicos [Maloney, 2001]. Sin embargo son comunes los casos en los que un aumento en las concentraciones de plaguicidas promueve el crecimiento de estos mismos, como por ejemplo, en el caso de la aplicación de atrazina, ametrina, terbutina y simazina se induce a una mayor adaptabilidad de los microorganismos aumentando así su tasa de crecimiento y la capacidad para la degradación de la atrazina [Ware, 2000]. La biodegradabilidad de los plaguicidas por parte de las bacterias ha sido ampliamente estudiada en contraste a el proceso de biodegradación por hongos, a pesar de que desde hace 3 décadas se tiene evidencia de que los hongos de la pudrición blanca son capaces de degradar una amplia gama de plaguicidas gracias a la secreción (no sólo a la producción, como en el caso de las bacterias) de enzimas no-específicas y no-estereoselectivas que conforman el sistema de degradación de lignina [Maloney, 2001].

Desde la década de los 80's se ha explorado la capacidad de los hongos basidiomicetos de pudrición blanca para participar en procesos de biorremediación [Hammel, 1986] siendo las ventajas que presentan estos hongos con respecto a los demás microorganismos degradadores la facilidad para alcanzar contaminantes de baja biodisponibilidad para otros microorganismos por propagación de hifas, la tolerancia a concentraciones considerablemente altas de contaminantes y como la capacidad para desarrollarse en medios con bajos valores de pH [Quintero-Díaz, 2011].

3.3.-ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIORREMEDIACIÓN

La degradación de compuestos xenobióticos por hongos está determinada por el orden en el que aparecen los microorganismos en el sistema; los primeros en desarrollarse son los hongos glucofílicos, sobre todo en el estado de esporas con un alto nivel germinativo y rápido crecimiento. Este grupo incluye a la mayoría de los hongos zoospóricos, mohos, levaduras y hongos imperfectos, todos estos hongos son capaces de germinar y crecer rápidamente y son los primeros en atacar sustratos frescos y compuestos simples. Cuando las fracciones simples se agotan por los hongos glucofílicos estos hongos fructifican y permanecen en estado de latencia. A continuación, aparecen dos grupos adicionales de hongos que son los celulolíticos, ascomicetes, hongos imperfectos y los lignolíticos que son basidiomicetos [Tórtora, 2007]. Los basidiomicetos suceden a los glucofílicos por su capacidad de sobrevivir en ambientes pobres en fuentes accesibles de carbono, lo que los convierte en candidatos para la biodegradación de compuestos recalcitrantes que contengan carbono; el aprovechamiento de estas fuentes de carbono lo realizan mediante tres mecanismos de tipo oxidativo y reductivo que degradan o modifican los compuestos xenobióticos sin ser empleados precisamente como sustratos para el crecimiento de los basidiomicetos, por lo que esta degradación se hace por co-metabolismo [Hammel, 1995].

El primero de los mecanismos de degradación es el sistema de degradación de la lignina (SDL), que realiza ataques oxidativos a moléculas orgánicas por medio de radicales libres generados por las enzimas lignino peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP), enzimas productoras de H₂O₂ (glioxal oxidasa, aryl alcohol oxidasa, etc.) y oxidasas (Lacasas) [Hofrichter, 2002].

El segundo mecanismo es también oxidativo, en el que intervienen las enzimas citocromo P-450 y monooxigenasas donde varios de los metabolitos producidos por las reacciones de este mecanismo comprenden fenoles, epóxidos, dihidrodioles y quinonas. El tercer mecanismo es reductivo, en el cual un conjunto de enzimas cataliza reacciones de conjugación con sulfato, ácido glucorónico, glutatión u otras moléculas [Quintero- Díaz, 2011].

4.- ANTECEDENTES

Se ha demostrado que la atrazina puede ser biodegradada del suelo por la acción de microorganismos sin embargo, el mecanismo mediante el cual se degrada este herbicida no ha sido estudiado por lo que se desconoce si este proceso ocurre por enzimas intracelulares o extracelulares. Aunque se ha evaluado la posible degradación de atrazina en suelo por la acción de extracto enzimático de basidiomicetos, en concreto por enzimas extracelulares, no está definido el papel principal de dichas enzimas [Chan-Cupul, 2014]. Los procesos de remoción y degradación en suelo son influenciados por numerosos factores, por ejemplo, la presencia de minerales tiene un efecto directo en la adsorción de atrazina [Gilchrist, 1993], en orden creciente los minerales presentes en suelo que aumentan la adsorción de atrazina son $Ca^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} < Fe^{3+}$ (FIGURA 4.1) [Herwig, 2001] además de que dichos procesos de adsorción orientan el equilibrio químico hacia la formación de atrazina protonada que por su carga puede interactuar formando enlaces [Fruhstorfer, 1993].

Muchos autores han reportado que existen dos fases de sorción de atrazina, la primera es un proceso rápido mientras que la segunda, aunque es más lenta, no es rápidamente reversible [Paris, 1980] [Macalady, 1984] [Karickhoff, 1985] lo que impide que la atrazina que participa en esta fase sea recuperada del medio por métodos de extracción convencionales como por ejemplo extracción con solventes orgánicos [Li, 1996], además de que por la carga que adquiere puede ser adsorbida en partes internas de las partículas de suelo disminuyendo considerablemente su disponibilidad. Por lo anterior para determinar el efecto de enzimas extracelulares en la remoción o degradación de la atrazina, es necesario evaluar su degradación directamente en el extracto enzimático, puesto que de esta manera las interacciones del herbicida con otros elementos y los procesos de sorción son prácticamente despreciables y además aumenta la biodisponibilidad.

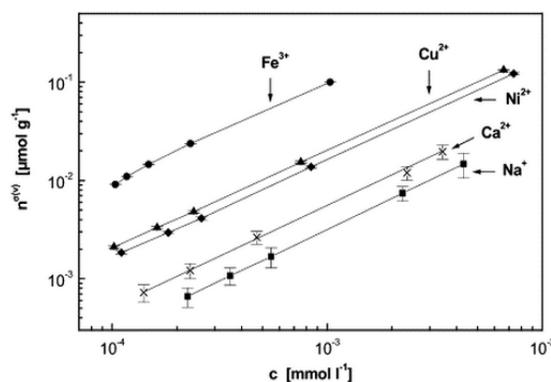


FIGURA 4.1: ADSORCIÓN DE ATRAZINA. Clave: Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} y Na^{+} en montmorilonita

Existen varios antecedentes que respaldan la teoría de que las triazinas son sustrato para ciertas enzimas y no sólo pueden ser biodegradadas por los basidiomicetos, sino también por otros hongos como *Aspergillus fumigatus* [Kaufman, 1965][Kearney 1965] que utiliza las triazinas como fuente de carbono y *Penicillium spp.* [Jensen, 1969] que las utiliza como fuente de nitrógeno. No obstante la mayoría de las investigaciones resaltan la capacidad de los basidiomicetos para degradar la triazina atrazina, incluso en experimentos en los que se ha marcado la atrazina con ^{14}C se demostró que la atrazina es biodegradada hasta la mineralización (CO_2) por *Pleorotus ostreatus* [Mougin y Ashther, 1996].

Aunque la mineralización de este contaminante por basidiomicetos está comprobada, aún no existe evidencia que señale la ruta enzimática o el metabolismo responsable de este proceso, debido a que la degradación de la atrazina sólo se ha evaluado en medio de cultivo (TABLA 4.1) sin excluir a la biomasa por lo que no se ha descartado la posibilidad de que la degradación de la atrazina ocurra intracelularmente. El mecanismo de degradación se puede deber tanto a enzimas extracelulares como intracelulares, no habiendo fuentes bibliográficas que comprueben o refuten alguna de las dos teorías.

Existe la posibilidad de que las enzimas extracelulares como la lacasa, debido a su baja especificidad y potencial redox tengan la capacidad de degradar la atrazina incluso hasta su mineralización puesto que, aunque no se ha reportado para atrazina, otros xenobióticos como el benzo[a]pireno y antraceno han sido degradados *in vitro* por lacasas extracelulares de *Trametes versicolor* [Collins, 1996] incluso a bajas concentraciones de la enzima. Por lo que un aumento en la actividad enzimática de lacasa de basidiomicetos como *Trametes sp.* mediante la inducción con co-cultivos optimizaría la degradación de xenobióticos y entre ellos la atrazina.

Se ha reportado que al confrontar micromicetos con basidiomicetos se forman co-cultivos en los cuales la excreción de enzimas y ERO's al medio aumenta considerablemente debido a la competencia entre hongos alcanzando para el caso del co-cultivo del micromiceto *P. carneus* contra el basidiomiceto *T. maxima*, actividades enzimáticas de 1,114 U/L de manganeso peroxidasa y 54,690 U/L de lacasa [Chan-Cupul, 2013].

Con base en este antecedente se propone como método de degradación de atrazina el uso del extracto enzimático con altas concentraciones de enzimas extracelulares descartando la biomasa y eliminando así la posibilidad de intervención de procesos de sorción a la biomasa y procesos intracelulares en la eliminación de atrazina.

TABLA 4.1

ANTECEDENTES DE REMOCIÓN DE ATRAZINA POR BASIDIOMICETOS					
Ppm	Días	Degradación /Remoción	Características	Basidiomiceto	Referencia
10	20	71%	Medio de cultivo (identificación de metabolitos)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pereira M., 2013
20	9	50%	Medio de cultivo (siringaldazina como inductor de lacasa)	<i>Carrena maxima</i>	Gorotova, 2005
4.31*	4	48%	Medio de cultivo	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	Mougin y Ashther, 1996
20	20	35%	Medio de cultivo	<i>Pleurotus Pulmonarius</i>	Masaphy, 1993

*ppb

5.- HIPÓTESIS

Los co-cultivos de hongos basidiomicetos con micromicetos favorecerán la remoción de atrazina con respecto al monocultivo de basidiomicetos, debido a la activación de enzimas extracelulares por inducción del micromiceto.

- a) La interacción en co-cultivo con micromicetos propiciará la producción de lacasas extracelulares del basidiomiceto.
- b) El aumento en la actividad enzimática de lacasa propiciará la remoción de atrazina

6.- OBJETIVOS

6.1.- OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar las condiciones óptimas que propicien la inducción enzimática de *T. maxima* en co-cultivo con los micromicetos.
2. Determinar el proceso de remoción de atrazina por enzimas y radicales liberados por los co-cultivos de hongos y comprobar su degradación mediante la cuantificación y caracterización de metabolitos de atrazina.

6.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar los co-cultivos que presenten mayor inducción de la enzima lacasa.
2. Determinación de condiciones óptimas de medios de cultivo mediante diseños experimentales para favorecer la actividad enzimática de lacasa tomando en cuenta la proporción C:N.
3. Determinación de la remoción de atrazina en presencia del extracto enzimático de él o los co-cultivos, en las condiciones óptimas para actividad enzimática.

CAPÍTULO II

7.- SELECCIÓN DE CO-CULTIVOS

7.1 -METODOLOGÍA

En la etapa inicial se realizó la selección de co-cultivos con *Trametes maxima* [Chan, 2004] y los micromicetos, *Aspergillus sp*, *Trichoderma atroviride* [Zúñiga-Silva, 2015], *Penicillium pinophilum*, *Penicillium sp.* y *Paecilomyces carneus*, que fueron aislados de suelo rizosférico de *Phragmites australis* colectado en La Mancha, Actopan, Veracruz; tanto el suelo como el agua de esta región están contaminados con atrazina por lo que al haber aislado a los hongos de esta localidad es muy probable que estos hongos hayan desarrollado un mecanismo de respuesta a la atrazina.

Los co-cultivos fueron reactivados en cajas petri con agar PDA, y al sexto día fueron transferidos a medios mínimos con la composición basada en agua sintética (AAS) con Glucosa 0.4 g/l, KH_2PO_4 0.02g/L y NH_4NO_3 0.03g/L [NOM-DIN 3841M]. La finalidad de utilizar un medio mínimo tiene 3 objetivos, el primero es verificar si existe actividad enzimática en condiciones no ligninolíticas (Relación C:N del medio 13:1); el segundo objetivo fue comprobar si de esta manera se puede inducir la degradación de atrazina al ser utilizada como fuente de Carbono y/o de Nitrógeno; el tercer objetivo fue evaluar la respuesta de actividad enzimática en co-cultivo sin inductores químicos. La atrazina disuelta en metanol se adicionó al AAS al alcanzar una temperatura entre 30 y 40°C (después de su esterilización), a cada caja petri se adicionó el volumen de etanol necesario para alcanzar concentraciones de 30 ppm y 5ppm de atrazina, el etanol se perdió por evaporación, todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Los co-cultivos se inocularon con 1 disco de 6mm de micelio-agar de *T. maxima* en el lado izquierdo de la caja petri mientras que el micromiceto se inoculó con 5 µl de una solución de 1×10^7 esporas/mL del lado derecho de la caja petri. Como controles se emplearon monocultivos de cada hongo en AAS con atrazina, así como co-cultivos y monocultivos en AAS sin atrazina.

En estos medios de cultivo se evaluó el crecimiento, interacción, actividad enzimática de Lacasa, MnP y la remoción de atrazina. El crecimiento se evaluó de manera radial empleando una escuadra milimétrica mientras que el tipo de interacción se evaluó de acuerdo a la escala establecida por Badalyan y colaboradores [Badalyan, 2004], que permite determinar la competitividad entre co-cultivos mediante la frecuencia de sus interacciones las cuales tienen asignado un valor numérico (TABLA 7.1.1).

TABLA 7.1.1:

ESCALA DE INTERACCIONES		
Clave	Descripción	Valor No.
<i>A</i>	Inhibición mutua al contacto.	1
<i>B</i>	Inhibición a distancia.	2
<i>C</i>	Reemplazo con crecimiento sin inhibición al contacto.	3
<i>C_{A1}</i>	Reemplazo parcial después de la inhibición al contacto.	3.5
<i>C_{A2}</i>	Reemplazo completo después de una inhibición al contacto.	4.5
<i>C_{B1}</i>	Reemplazo parcial después de una inhibición a distancia.	4
<i>C_{B2}</i>	Reemplazo completo después de una inhibición a distancia.	5

Determinar la frecuencia de tipos de interacción entre co-cultivos es importante ya que nos permite estimar la competitividad mediante el índice de antagonismo (IA), que se calcula mediante la fórmula $IA = \sum nx1$ donde “n” es la frecuencia en número de cada tipo o subtipo de interacción y “1” es escala correspondiente. En este caso se determina el índice de antagonismo *T. maxima* mediante la frecuencia de interacciones con los hongos micromicetos.

La actividad enzimática se evaluó al momento de la confrontación (interacción de micelios) entre *T. maxima* y el micromiceto. El extracto enzimático se obtuvo tomando cinco discos de agar de la zona de confrontación y depositándolos en 5 mL de agua desionizada estéril, el agua con los discos se agitó durante 15 min y centrifugó a 7000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se tomó para la cuantificación de Lacasa [Bourbonnais, 1988][Sunil y col. 2011], MnP [Glenn, 1983], H₂O₂ [Klassen, 1994] y proteína mediante el método de Bradford [Bradford, 1976], el valor de R² para las curvas de calibración de H₂O₂ y proteína total fue de 0.99 y 0.96 respectivamente (VER ANEXO I).

La remoción de atrazina en AAS por los co-cultivos se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) extrayendo el herbicida del agar empleando acetonitrilo como solvente, alícuotas de 20 µL de las muestras se leyeron a 222 nm [On-Anong, 2008]. La cuantificación se realizó en un HPLC ThermoScientific acoplado a un detector de arreglo de diodos cuya fase estacionaria consistió en una columna Restek C18 de 5 µm de partícula (150 mm y 4.5 mm) y como fase móvil se empleó Acetonitrilo:Agua 70:30 con la cual la Atrazina presentó un tiempo de retención de 3.5 minutos.

7.2.-RESULTADOS

7.2.1 INTERACCIÓN EN CO-CULTIVOS

Los co-cultivos se definen como 2 poblaciones diferentes que conviven en un mismo espacio delimitado, sin embargo para que esta interacción se lleve a cabo las especies involucradas deben estar en equilibrio por lo menos en un periodo de tiempo sin que una especie inhiba por completo el crecimiento del otro, por ello es necesario considerar el índice de antagonismo que ejerce el basidiomiceto sobre los hongos filamentosos.

El índice de antagonismo (IA) se determinó mediante la frecuencia del tipo de interacciones de *T. maxima* con los micromicetos, las cuales tiene un valor numérico. Para el caso de *Trametes maxima* la mayoría de las interacciones con los micromicetos fueron inhibiciones a distancia (Tabla 7.2.1), por lo que el índice de antagonismo (IA) de *Trametes maxima* tuvo un valor de 10.5 lo que lo clasifica como moderadamente activo, esto quiere decir que no tuvo la capacidad de inhibir por completo el crecimiento de los micromicetos pero que resistió a la inhibición total por parte de los micromicetos, por lo que *Trametes maxima* se define como un basidiomiceto con la capacidad de formar co-cultivos.

TABLA 7.2.1

RESUMEN DE INTERACCIONES ENTRE MICROMICETOS Y <i>TRAMETES MAXIMA</i>					
Interacción	TRIC	PEN	PEN2	ASP	PAE.
Tipo	B	B	A	C _{A1}	B
Valor numérico	2	2	1	3.5	2

Abreviaturas: TRIC.= *T. atroviride*, PEN.= *P. pinophilum*, PEN2.=*Penicillium sp.* ASP.= *Aspergillus sp.* PAE. = *Paecilomyces Carneus*

Penicillium sp. fue el único micromiceto cuya inhibición fue por contacto, lo que indica que existe cierta compatibilidad entre *Penicillium sp.* y *T. maxima*, esta compatibilidad se reflejó en la inducción de actividad enzimática de MnP y lacasa que no es significativa con respecto al control del monocultivo de *T. maxima*, a diferencia de las otras interacciones; esto debido a que *T. maxima* puede coexistir con *Penicillium sp.* y mientras no se compita por el espacio o por nutrientes se deduce que no es necesario que *T. maxima* secrete enzimas ni otras sustancias para inhibir a *Penicillium sp.* por lo que no hubo inducción enzimática (FIGURA 7.2.1), este motivo justificó el descarte de este micromiceto para la conformación de co-cultivos ya que no indujo la producción de lacasa.

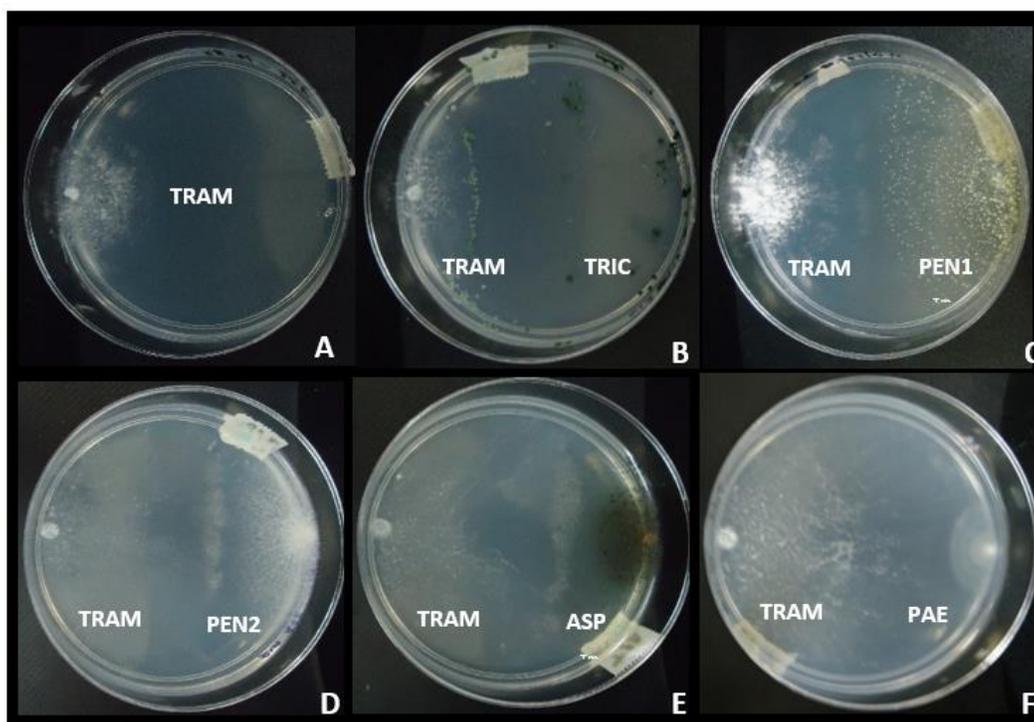


FIGURA 7.2.1: TIPOS DE INTERACCIÓN EN CO-CULTIVOS. Inhibición a distancia en B), D) y F); inhibición por contacto en C) e inhibición por contacto con reemplazo en E). TRAM= *Trametes máxima*, TRIC=*Trichoderma atroviride*. PEN2= *Penicillium sp.* PEN1=*Penicillium pinophylum*, ASP= *Aspergillus sp.* PAE= *Paecilomyces carneus*.

7.2.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de Lacasa en *T. maxima* es constitutiva, a ello se debió el hecho de que la actividad de esta enzima fuera cuantificable incluso en ausencia de atrazina o de la presencia de un micromiceto (co-cultivo), sin embargo en el medio AAS con atrazina en 30 ppm la actividad enzimática de lacasa con respecto al control de *T. maxima* incrementó 12.11 veces ($p < 0.05$) mientras que en el medio ASS con 5ppm de atrazina el incremento fue de 2.97 veces ($p < 0.05$), lo que sugirió que la atrazina es un factor más estresante para el basidiomiceto *T. maxima* que la presencia de micromicetos (en co-cultivo), de hecho los únicos co-cultivos en los cuales la actividad de lacasa mostró incrementos significativos fueron los de *T. maxima* con *Trichoderma atroviride* y *T. maxima* con *P. carneus* (FIGURA 7.2.2.1) aunada al incremento por presencia de atrazina ya mencionado anteriormente. Los cocultivos en los que *T. maxima* presentó mayor actividad enzimática fueron con *Trichoderma atroviride*, *P. pinophilum* y *P. carneus*, sin embargo sólo el co-cultivo con *Trichoderma atroviride* y *Paecilomyces carneus* presentan diferencias significativas con respecto al control (TABLA 7.2.2.1).

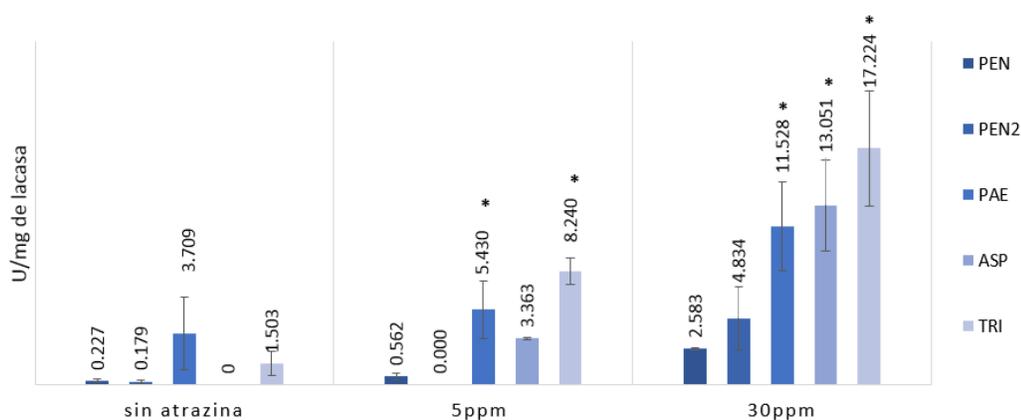


FIGURA 7.2.2.1: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA. Clave TRI.: *T. atroviride*, PEN.: *P. pinophilum*, PEN2.: *Penicillium sp.*, ASP.: *Aspergillus sp.* PAE.: *Paecilomyces Carneus* y Tm: *T. maxima*. (*) Muestra diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al co-cultivo sin atrazina determinadas con *t de student*

TABLA 7.2.2.1

INCREMENTO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA						
U/mg de Lacasa				Incremento		
Co-C	Co-C	Co-C+ ATZ [5ppm]	Co-C + ATZ [30ppm]	Co-C	Co-C + ATZ [5ppm]	Co-C + ATZ [30ppm]
T-TRI	1.503 ±0.009	8.240±0.010	17.224±0.042	0.912	8.203	17.02
T-PEN	ND	0.562±0.003	2.833±0.002	0.2	0.5	-
T-ASP	ND	3.363±0.001	14.071±0.030	-	-	-
T-PEN2	ND	ND	4.834±0.043	-	-	8.05
T-PAE	3.709±0.026	5.430±0.030	11.528±0.052	29.67	22.625	11.53

Clave: Co-c: co-cultivo, ATZ: atrazina, TRI.: *T. atroviride*, PEN.: *P. pinophilum*, PEN2: *Penicillium sp.* ASP.: *Aspergillus sp.* PAE.: *Paecilomyces carneus* y T: *T. maxima*.

La actividad de MnP no muestra una tendencia en todos los co-cultivos como la lacasa, si no que cada co-cultivo muestra incremento o inhibición en diferentes condiciones, por ejemplo, la actividad de MnP en ciertos co-cultivos como en el caso de *T. maxima* con *Penicillium pinophilum* y *Trichoderma atroviride* se inhibe en medio ASS con la concentración más baja de atrazina (5ppm) e incrementa con la concentración mayor (30ppm) mientras que en otros co-cultivos como *T. maxima* con *P. carneus* y *Penicillium sp.* ocurre de manera inversa (FIGURA 7.2.2.2).

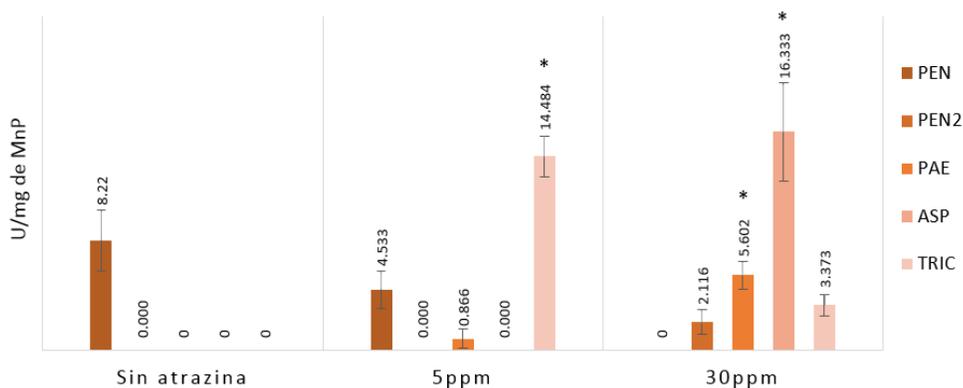


FIGURA 7.2.2.2: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MNP. Clave TRI.: *T. atroviride*, PEN.: *P. pinophilum*, PEN2.: *Penicillium sp.*, ASP.: *Aspergillus sp.* PAE.: *Paecilomyces Carneus* y Tm: *T. maxima*. * Muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al co-cultivo sin atrazina determinadas con *t de student*

TABLA 7.2.2.2

INCREMENTO EN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MnP						
Co-C	MnP U/l			Incremento		
	Co-C	Co-C + ATZ [5ppm]	Co-C + ATZ [30ppm]	Co-C	Co-C + ATZ [5ppm]	Co-C + ATZ [30ppm]
T-TRI	N.D.	14.484±0.125	3.373±0.006	-	-	3.12
T-PEN	8.22±0.049	4.533±0.014	N.D.	2.97	4.51	-
T-ASP	N.D.	N.D	16.333±0.277	-	-	15.22
T-PEN2	N.D.	N.D.	2.116±0.033	-	-	2.01
T-PAE	N.D.	0.866±0.007	5.602±0.011	-	21.121	-

Clave Co-c: co-cultivo, ATZ: *atrazina*, TRI.: *T. atroviride*, PEN.: *P. pinophilum*, PEN2.: *Penicillium sp.*, ASP.: *Aspergillus sp.* PAE.: *Paecilomyces Carneus* y T: *T. maxima*.

Probablemente existe una tendencia en la respuesta de MnP a los co-cultivos y a la concentración de atrazina, sin embargo es difícil determinar esta tendencia debido a que las mediciones realizadas fueron puntuales al momento de la confrontación entre cultivos y no a través del tiempo, por lo que si en algún intervalo ajeno a la toma de muestra se presentó algún incremento en la actividad no fue posible detectarlo. Aunado a este hecho está el antecedente de que en presencia de Atrazina la producción de MnP no es sostenida si no que presenta varios picos de actividad, probablemente en respuesta a los metabolitos productos de la degradación del herbicida o de nutrientes [Gorotova, 2005]. Existen también antecedentes que señalan la inhibición de MnP de los basidiomicetos cuando están en co-cultivo con algunas especies (Badalyan, 2004), sin embargo en este caso la actividad de MnP se ve incrementada por los co-cultivos (FIGURA 7.2.2.2), mientras mayor fue la compatibilidad entre las especies menor fue la inducción de MnP, por ello la menor actividad se registra en el co-cultivo de *T. maxima*-*Penicillium sp.* y la mayor actividad enzimática de *T. maxima* se produjo en co-cultivo con *Aspergillus sp.* en medio ASA con 30ppm de atrazina (TABLA 7.2.2.2).

7.2.3.- REMOCIÓN DE ATRAZINA

En general el porcentaje de remoción de atrazina resultó mayor en los monocultivos que en co-cultivos; sin embargo el co-cultivo que presentó remoción de atrazina fue el de *T. maxima*-*P. carneus*. En algunas cepas en monocultivo se observó un patrón en el cual la capacidad de remoción incrementó al incrementar la concentración de atrazina como en el caso de *T. maxima*. y *P. pinophilum* lo que puede referir a que estas cepas utilicen la atrazina como fuente de carbono o nitrógeno, mientras que en otras cepas en monocultivo la remoción a concentraciones de 30 ppm de atrazina fue nula.

A una concentración de 30 ppm, el máximo porcentaje de remoción obtenido fue de 58.66 % para el monocultivo de *T. maxima*, seguido por un 32.54% de remoción por el monocultivo de *P. pinophilum* (FIGURA 7.2.3) y a bajas concentraciones de atrazina (5ppm) el mayor porcentaje de remoción correspondió al co-cultivo de *P. carneus* con *T. maxima*. El monocultivo de *Penicillium sp.* no presentó capacidad de remoción en ninguno de los casos. Pese a la evidencia anterior no se puede afirmar que la remoción de atrazina se deba a que está siendo utilizada como fuente de carbono o de nitrógeno, debido a que no se presentaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los hongos a concentraciones de 5ppm y 30 ppm; de utilizarse la atrazina como fuente de carbono o de nitrógeno se esperaría que las cepas sembradas en agar con mayor concentración de atrazina presentaran mayor crecimiento.

Otra explicación que probablemente justifique mejor los patrones de remoción es que la actividad enzimática tenga un rol importante en dicha remoción ya que así como la actividad de enzimas de *T. maxima* incrementa con la concentración de atrazina es probable que ocurra lo mismo con algunas enzimas de los micromicetos en monocultivo, en especial para el caso de *P. pinophilum* aunque aunado a esto pueden influenciar los procesos de sorción de atrazina por biomasa fúngica.

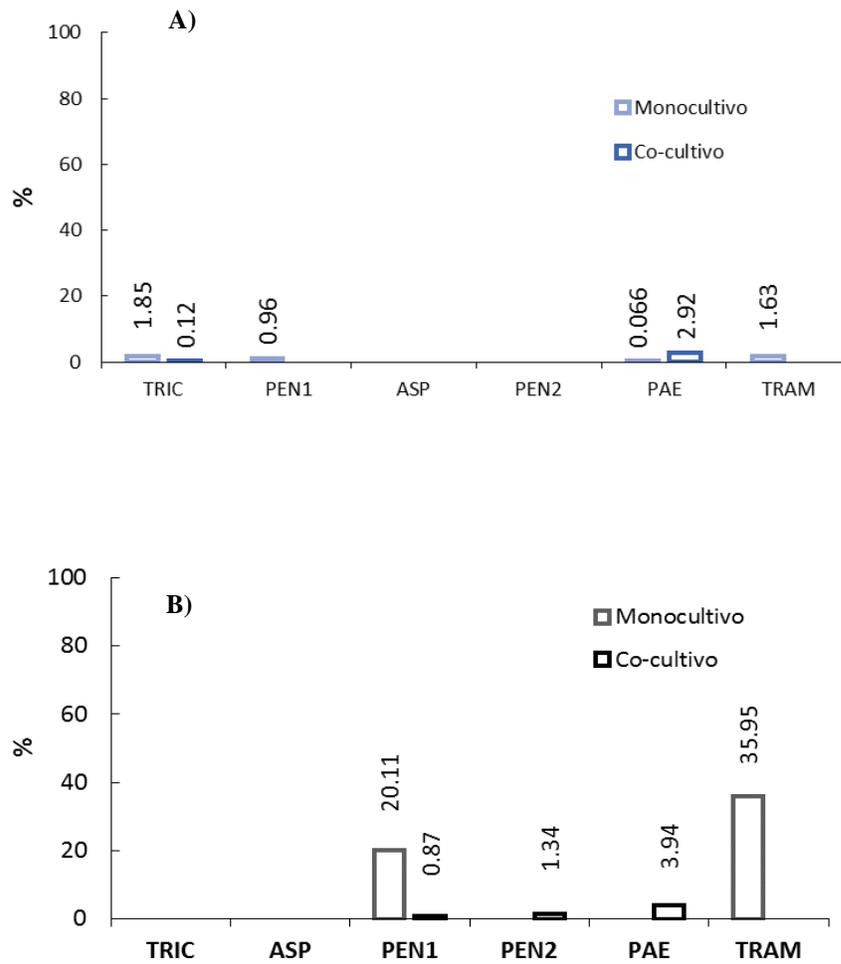


FIGURA 7.2.3.1: GRÁFICO DE REMOCIÓN DE ATRAZINA. Remoción por monocultivos y co-cultivos con *T. maxima*. A) Porcentaje de remoción a 5 ppm de atrazina. B) Porcentaje de remoción a 30 ppm. TRIC.: *T. atroviride*, PEN1.: *P. pinophilum*, PEN2.: *Penicillium sp.* ASP.: *Aspergillus sp.* PAE.: *Paecilomyces carneus* y TRAM: *T. maxima*.

CAPITULO III

8.- RESPUESTA FÚNGICA A LA PRESENCIA DE ATRAZINA

8.1-METODOLOGÍA

Se evaluó la tolerancia a atrazina de los hongos micromicetos *Trichoderma atroviride* y *Paecilomyces carneus*, de los cuales se demostró que fueron capaces de inducir la actividad enzimática de *T. maxima*, de igual manera se evaluó la tolerancia del basidiomiceto *Trametes maxima* a la atrazina.

Las concentraciones de atrazina empleadas en campo son de 2500 ppm al momento de la aplicación, por ello, la concentración límite de atrazina para determinar la tolerancia a atrazina fue de 3000 ppm, aunque las concentraciones en campo generalmente no superan las 5 ppm. La concentración inhibitoria media (C.I.₅₀) de atrazina para los hongos se determinó mediante la medición del crecimiento radial y el porcentaje de inhibición en medio semisólido con atrazina. Los hongos se inocularon en medio EMA (extracto de malta agar) al cual se le adicionó herbicida GESAPRIM calibre 90° (90 % de atrazina como ingrediente activo) en concentraciones de 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000ppm de atrazina. La C.I.₅₀, dosis a la que se inhibe el 50% de crecimiento de los hongos, fue determinada mediante un análisis *Probit* con el paquete estadístico SAS® con base a los porcentajes de inhibición del crecimiento. Para el monocultivo de *T. maxima*, se evaluó además la respuesta enzimática de Lacasa, MnP y Lip a las concentraciones de atrazina mencionadas.

Se ha reportado que varios cambios en el metabolismo de los hongos están relacionados con cambios morfológicos, por lo que es probable que la atrazina afecte la estructura morfológica de los hongos y esto influya en la respuesta al herbicida.

Con el fin de evaluar la existencia de cambios a nivel morfológico de *T. maxima* en estrés tanto biótico como abiótico este basidiomiceto fue inoculado en cámaras húmedas (FIGURA 8.1.1) con medio MEA con atrazina (estrés abiótico), en co-cultivo con *P. carneus* (estrés biótico) y en co-cultivo en medio con atrazina, con sus respectivos controles en monocultivo sin atrazina. La tinción utilizada para la observación microscópica fue azul de lactofenol.

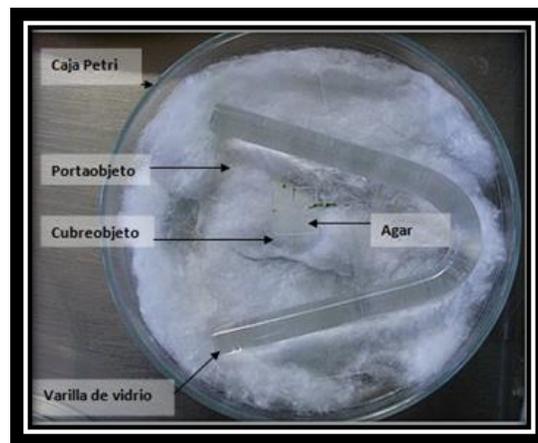


FIGURA 8.1.1: ESTRUCTURA DE CÁMARA HÚMEDA Y SUS COMPONENTES

8.2.- RESULTADOS

8.2.1.- PORCENTAJE DE INHIBICIÓN Y E C.I.₅₀

De los micromicetos evaluados el que presentó mayor tolerancia a altas concentraciones de atrazina fue *T. atroviride* ya que la C.I.₅₀ para este hongo fue de 2901 ppm (I. C. 2708-3114) seguido de *P. carneus* cuya C.I.₅₀ fue de 2404 ppm (I. C. 2172-2649), la tolerancia a atrazina de *T. atroviride* puede deberse a su rápida tasa de crecimiento que es 3.5 veces mayor que la de *P. carneus* (TABLA 8.2.1.1) lo que le permite acceder a nutrientes del medio y de esta manera soportar mejor el estrés inducido por la atrazina. Para *T. maxima* la C.I.₅₀ fue de 3118ppm (I.C. 2934-3322).

TABLA 8.2.1.1

RESULTADOS DE CRECIMIENTO EN MEDIO MEA CON ATRAZINA						
Crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>.						
Atrazina [ppm]	0	1000	2000	3000	4000	5000
T. C. en mm	8.3	7.5	5.9	4.1	3.06	2.7
% I.	0	10	29.3	50.7	63.3	67.3
Crecimiento de <i>Paecilomyces carneus</i>						
Atrazina [ppm]	0	1000	2000	3000	4000	5000
T. C. en mm	2.4	1.28	1.9	1.3	1.2	0
% I.	0	46.5	20.9	44.9	48.8	100
Crecimiento de <i>Trametes maxima</i>						
Atazina [ppm]	0	1000	2000	3000	4000	5000
T. C. en mm	8.3	6.7	6	4.4	2.7	2.4
% I.	0	19.	28	47.3	68	71.3

Clave: concentración de atrazina [ATZ] en partes por millón (ppm) y la respuesta de la tasa de crecimiento (T.C.) en mm. y porcentaje de inhibición (% I.) correspondientes a cada concentración.

8.2.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

No se detectó actividad enzimática de MnP ni de LiP, solamente se detectó actividad enzimática de lacasa. Los resultados obtenidos señalan que la atrazina tiene cierta capacidad inductora en la actividad de lacasa (TABLA 8.2.2.1), otra conclusión más relevante de este experimento es que con ninguna de las concentraciones de atrazina evaluadas se inhibió la actividad de lacasa, por lo que la enzima lacasa de *T. maxima* posiblemente sea un mecanismo para degradación de atrazina, también se observó que existe cierta correlación entre la producción de lacasa y la concentración de atrazina hasta la concentración de 4000 ppm (TABLA 2.2.2.1), por lo tanto con el fin de corroborar dicha tendencia se repitió el experimento con concentraciones de atrazina más cercanas dentro del intervalo en el que parece observarse cierta linealidad en la actividad (de 0 a 3000 ppm); estas concentraciones fueron de 100, 400, 800, 1200, 1400, 1800, 2200, 2400, 2800 y 3200 ppm.

TABLA 8.2.2.1

ACTIVIDAD DE LACASA EN MEDIO CON ATRAZINA						
ATZ [ppm]	0	1000	2000	3000	4000	5000
U/L	10.72±0.04	206.25±41	241.45±48.2	224.55±44.8	211.06±21	184.89±30

Concentración de atrazina (ATZ) en medio MEA reportada en partes por millón (ppm) y la actividad enzimática de lacasa de *T. maxima* reportada en unidades sobre litro (U/L) de lacasa.

Los resultados de este experimento demuestran que en efecto existe una correlación de $R^2 = 0.87$ entre U/mg de lacasa y ppm de atrazina en el medio (FIGURA 8.2.2.1 B), esta correlación se mantiene hasta la concentración de 2400 ppm ya que en concentraciones mayores a dicha cantidad la actividad de lacasa muestra una tendencia hacia la disminución (FIGURA 8.2.2.1 A), pero como se mostró en los resultados anteriores la actividad de lacasa no se inhibió incluso con concentraciones de 5000 ppm, esta correlación puede indicar que si la lacasa generalmente es liberada al medio para degradar compuestos tóxicos para el hongo, la atrazina puede ser sustrato de esta enzima.

Para corroborar los resultados de C.I.₅₀ obtenidos con el análisis *Probit* este análisis se repitió midiendo el crecimiento radial de *T. maxima* en medio con las concentraciones de atrazina de 100, 400, 800, 1200, 1400, 1800, 2200, 2400, 2800 y 3200ppm. Los resultados del análisis *Probit* (analizado con el paquete estadístico SAS®) para determinar la C.I.₅₀ coinciden con los obtenidos anteriormente, dicho valor fue de 3,118 ppm, la reproducibilidad de este resultado indica la precisión del análisis para determinar este parámetro.

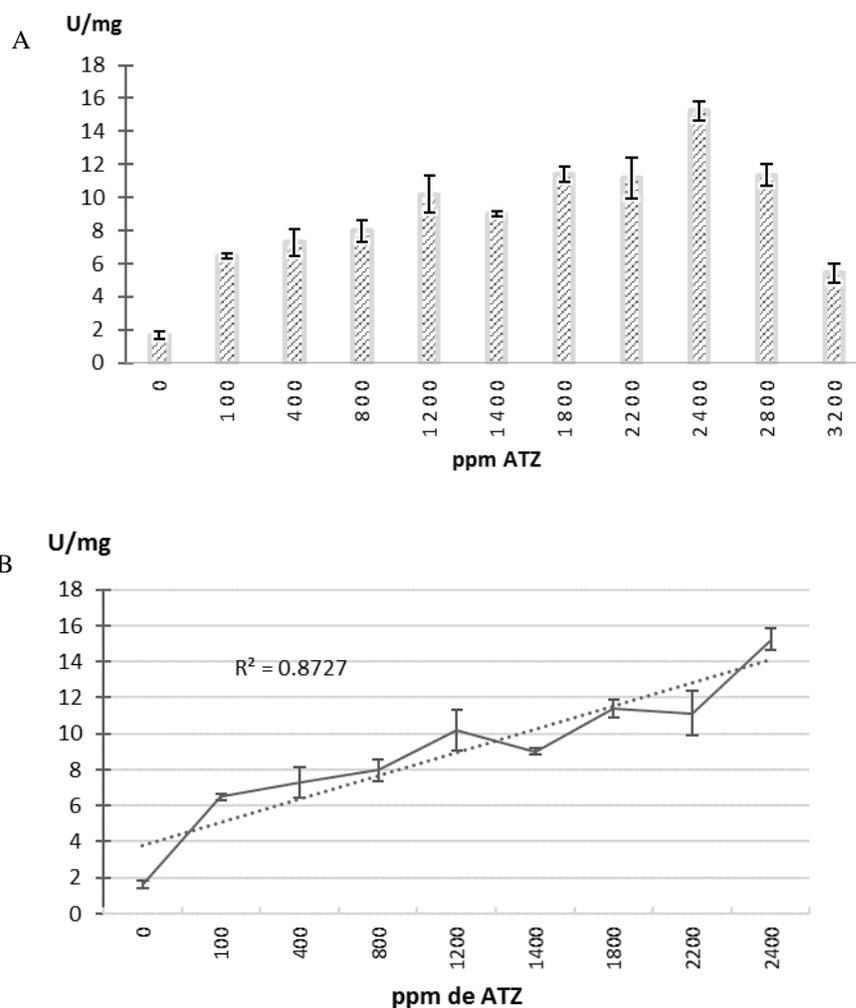


FIGURA 8.2.2.1: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA EN RESPUESTA A ATRAZINA. A) se muestra la actividad de lacasa relacionada con la concentración de atrazina correspondiente B) Se muestra una correlación lineal ente la respuesta de actividad específica de lacasa y la concentración de atrazina.

8.2.3.- CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA Y CO-CULTIVO.

Los basidiomicetos tienen una fase miceliar en la que las basidiosporas, al encontrar un medio propicio para la germinación forman hifas, esta es la fase en la que se estudiaron los cambios morfológicos de *T. maxima* provocados por la atrazina y el co-cultivo con el objetivo de poder compararlo con los cambios morfológicos de *P. carneus*, pues este al ser un micromiceto solo cuenta con la fase miceliar. La morfología del control de *T. maxima* en monocultivo y sin atrazina está formada de micelios vegetativos con hifas cenocíticas que presentan basidiosporas mientras que el micelio aéreo está compuesto por hifas más delgadas. *P. carneus* tiene micelio vegetativo formado por hifas septadas cortas con ramificación unilateral. El micelio reproductor está diferenciado a partir de las hifas vegetativas, formando fiálides con esporas en disposición basípeta (la espora más joven está unida a la fiálide), las conidias son ovoides, alargadas y opacas.

El único cambio morfológico producido por la atrazina y por el co-cultivo fue la aparición de vesículas no refringentes intensamente teñidas en *T. maxima* (FIGURA 8.2.3.1), probablemente las estructuras sean de un pH básico o estén compuestas de quitina, ya que el azul de lactofenol tiene especial afinidad por estas estructuras. Para determinar si estos cambios fueron significativos se contó el número de vesículas por campo, en medio con atrazina *Trametes maxima* tuvo un promedio de 18 ± 3 vesículas por campo, mientras que en co-cultivo el número de vesículas promedio por campo fue de 35 ± 7 , en co-cultivo con atrazina el aumento en el número de vesículas no fue significativo en comparación con el número de vesículas de *T. maxima* en co-cultivo con *P. carneus*. Las vesículas en hongos transportan enzimas necesarias para la formación de la pared celular sin embargo, debido al tipo de interacción entre *P. carneus* y *T. maxima* se descartó que exista daño celular en *T. maxima* y el aumento en vesículas tenga como finalidad la restauración de la pared celular.

Otra función de las vesículas consiste en secuestrar compuestos tóxicos para disminuir los efectos dañinos al microorganismo, y resulta más probable que el incremento en el número de vesículas se deba a que las sustancias secretadas al medio por *P. carneus* o la atrazina sean secuestrados en estas vesículas y por ello incrementen en número.

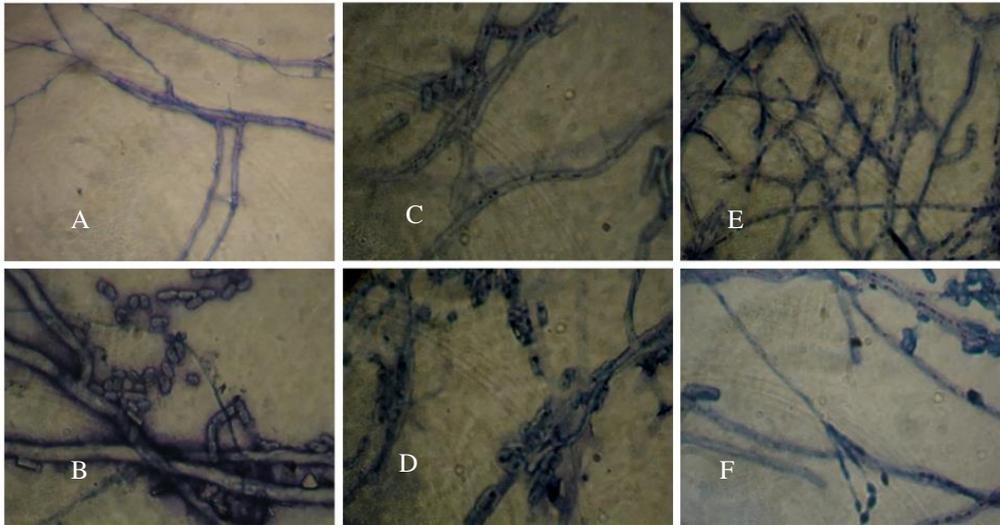


FIGURA 8.2.3.1: CAMBIOS MORFOLÓGICOS MICROSCÓPICOS. A) se muestra micelio aéreo de *T. maxima* en monocultivo B) se muestra micelio vegetativo de *T. maxima* en monocultivo C) y D) micelio vegetativo de *T. maxima* en MEA con 30 ppm de atrazina E) micelio vegetativo de *T. maxima* y *P. carneus* en co-cultivo F) micelio aéreo de *T. maxima* y *P. carneus* en con sus respectivas esporas.

CAPITULO IV

9.-OPTIMIZACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA ACTIVIDAD DE LACASA.

9.1- METODOLOGÍA

En la segunda etapa se evaluó el comportamiento de los co-cultivos en medio líquido de los hongos micromicetos *P. carneus* y *T. atroviride*, que presentaron capacidad de inducir actividad enzimática de *T. maxima*, ya que se asume que tanto la actividad enzimática como la compatibilidad pudiesen cambiar en este medio con respecto al agar debido a la disponibilidad de nutrientes que en agar está limitada por el área de crecimiento del hongo, mientras que en medio líquido la interacción es inmediata y los nutrientes son consumidos de manera homogénea [Georgiou, 1986]. Los resultados señalan que el comportamiento en cuanto a la inducción enzimática aumenta al inocular los co-cultivos en medio líquido en comparación con el co-cultivo inoculado en medio semisólido (agar), mientras que en cuanto a la compatibilidad no hubo evidencia que señalara que en medio líquido se viera afectada.

9.1.1.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CONDICIONES “LIGNINOLÍTICAS” Y “NO LIGNINOLÍTICAS”.

Varias referencias bibliográficas señalan que tanto la producción como la actividad enzimática aumentan en medios “ligninolíticos” los cuales debido a su baja concentración de nitrógeno promueven la inducción de enzimas ligninolíticas, entre ellas, la lacasa [Kannaiyan, 2014][D'Agostini, 2011][Sivakumar, 2012], mientras que la concentración ideal de glucosa favorece la actividad enzimática ligninolítica a concentraciones menores a 3.5g/L [Li, 2011] sin embargo es posible que debido al co-cultivo las condiciones ligninolíticas de estos medios no favorezcan la inducción enzimática, por ello se evaluó el comportamiento enzimático de *T. maxima* en co-cultivo en medio “ligninolítico” y “no ligninolítico”.

Se inocularon 125 mL de medio “ligninolítico” y “no ligninolítico” con 4 discos de 4mm micelio-agar de *T. máxima*; la composición básica de los 2 medios se conformó por glucosa (5g/L), $MgSO_4$ (2g/L) y KH_2PO_4 (2g/L), las concentraciones de peptona biotriptica, extracto de levadura, NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno fueron modificadas para obtener medios de cultivo con relación C:N 1:2 para el medio no ligninolítico y 10:1 para el medio ligninolítico, se cuantificó la actividad enzimática de lacasa y MnP, además de que se cuantificó proteína, H_2O_2 , pH, biomasa y glucosa durante 6 días después de la inoculación con el micromiceto. A los 5 días (tiempo en el que se registró la mayor actividad enzimática de lacasa en el monocultivo de *T. maxima*) se inoculó el medio con 100 μ L de solución de esporas del micromiceto para formar el co-cultivo.

9.1.2.- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA EN CO-CULTIVO

El medio no ligninolítico resultó más favorable para la actividad enzimática de *T. maxima* en co-cultivo, por lo que partiendo de este principio se seleccionó el medio con mejores condiciones para aumentar la actividad enzimática de lacasa mediante DCC (diseño compuesto central). La optimización de la actividad enzimática se basó en el medio propuesto por Chan-Cupul [Chan-Cupul, 2014] en el cual mediante un diseño experimental Plackett–Burman se determinó que los factores más influyentes en la respuesta enzimática de *T. maxima* en co-cultivo son las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (ECUACIÓN 9.1.2.1). La proporción C:N se optimizó mediante DCC de 2^{2^2} cuyos factores son la glucosa y $(NH_4)_2SO_4$, para la actividad de lacasa que fue evaluada como respuesta (cuantificada cada 24 hr.); aunque el extracto de levadura también es una fuente de nitrógeno no presentó tener una influencia significativa en la respuesta evaluada (actividad de lacasa) por lo que este factor no se incluyó en el diseño de DCC pero se consideró al determinar la proporción C:N de las corridas del diseño.

El medio fue inoculado inicialmente con *T. maxima* y posterior a un periodo de 72 hr. fue inoculado con el micromiceto en 2 discos micelio agar de 5 mm; la desviación estándar se calculó con 3 puntos centrales.

ECUACIÓN 9.1.2.1

$$\ln(Lacasa) = 9.39 + 0.32 \text{ Glucosa} + 0.048 \text{ E.levadura} - 0.22 \text{ k} + 0.28 \text{ N} + 0.037 \text{ Mg} - 0.12 \text{ Ca} - 0.20 \text{ Fe} + 0.29 \text{ Mn} + 0.12 \text{ Zn} + 0.15 \text{ Cu} - 0.30 \text{ Inóculo}$$

9.1.3.- ACTIVIDAD DE PROTEASAS.

Las proteasas son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas y cuentan con capacidad para degradar una amplia gama de proteínas, entre ellas a las enzimas, reduciéndolas a cadenas peptídicas o a sus aminoácidos constituyentes lo que destruye su capacidad catalítica. Según el sitio de acción hidrolítico se clasifican como exoproteasas o endoproteasas siendo este último grupo el que posee mayor rango de mecanismos catalíticos, de este grupo mencionado las proteasas más predominantes son las aspartato y serin proteasas [North, 1982]. Las proteasas también se clasifican con base en el rango de pH en el que presentan actividad en básicas, ácidas y neutras.

A diferencia de las proteasas bacterianas las proteasas fúngicas generalmente son extracelulares, por lo que tienen como sustrato proteínas extracelulares, como la lacasa, que al ser una enzima cuyo óptimo de actividad es en pH de 4.5, las proteasas ácidas producidas por los micromicetos serían las más perjudiciales para la estructura y actividad de la enzima. Por lo anterior se cuantificó la actividad de proteasas ácidas en medio gastado por el método de degradación de hemoglobina [Anson, 1938][Asakuraet, 1997] en 1.5 mL de reacción se evaluó por triplicado la actividad de proteasas ácidas de *T. atroviride*, *P. carneus* y *T. maxima* tanto en monocultivo así como en co-cultivo, donde los micromicetos fueron inoculados al tercer día después de la inoculación con *T. maxima*.

En los mismos medios de cultivo líquido mencionados se evaluaron por triplicado cualitativamente proteasas neutras y alcalinas mediante la medición del halo de degradación por extracto enzimático correspondiente a 24 hr. después del día de máxima actividad enzimática impregnado en discos papel filtro de 5 mm de diámetro, los discos fueron incubados en agar con 2% de caseína durante 24 y 48 horas.

9.1.4 FORMACIÓN DEL INÓCULO

La forma de inóculo es un factor que regularmente no se considera para la comparación de experimentos y se le otorga poca influencia en los resultados de un experimento, a la fecha, existen pocos reportes que indiquen que la forma de inocular el medio tiene una influencia significativa en la actividad enzimática. Con el motivo de confirmar la forma de inóculo más adecuada para promover una mayor inducción se inoculó *P. carneus* a las 72 hr. posteriores al inóculo de *T. maxima* (en disco micelio agar) en medio optimizado, la única variable fue la forma de inocular *P. carneus*, el cual se inoculó de dos maneras: en 2 discos micelio-agar y en 1 mL de solución de esporas. Para asegurar la misma cantidad de inóculo de micromiceto para las 2 formas de inóculo 2 discos micelio agar se sonicaron por 5 minutos en 1 mL de agua estéril, para posteriormente homogeneizar con agitación en vórtex; la concentración de esporas fue de 4.2×10^6 .

9.2.- RESULTADOS

9.2.1.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MEDIO CON CARACTERÍSTICAS “LIGNINOLÍTICAS” Y “NO LIGNINOLÍTICAS”.

Para el caso del monocultivo de *T. maxima* no se registraron cambios significativos en cuanto a la actividad específica máxima en el medio de cultivo ligninolítico (9.6 U/mg de lacasa) y medio no ligninolítico (9.5 U/mg de lacasa), sin embargo en el medio de cultivo con características no ligninolíticas el máximo de actividad se registró a los 3 días mientras que en el medio con características no ligninolíticas este máximo en la actividad de lacasa se registró a los 8 días, esta tendencia se repitió en los co-cultivos en donde la diferencia entre actividad enzimática fue más evidente, en el co-cultivo de *P. carneus* con *T. maxima* el incremento en el máximo de actividad enzimática de lacasa fue de 1.5 veces en medio con características no ligninolíticas (FIGURA 9.2.1.1 A) y como se mencionó anteriormente el máximo de actividad se alcanzó antes de 10 días mientras que para los co-cultivos en medio con características ligninolíticas la máxima actividad se alcanzó después de los 10 días (FIGURA 9.2.1.1 B).

En el co-cultivo de *T. maxima* con *T. atroviride* la actividad enzimática de lacasa de *T. maxima* disminuyó con respecto al control tanto en el medio con características ligninolíticas como no ligninolíticas, esto probablemente debido a la actividad de proteasas secretadas por *T. atroviride*, las cuales se ha reportado que son inducidas por fuentes de nitrógeno lo que justifica el hecho de que en el medio ligninolítico, que tiene una proporción de C:N 1:2 la actividad específica de lacasa en co-cultivo con *T. atroviride* sea menor que en el mismo co-cultivo pero en medio no ligninolítico que contiene una menor proporción de nitrógeno.

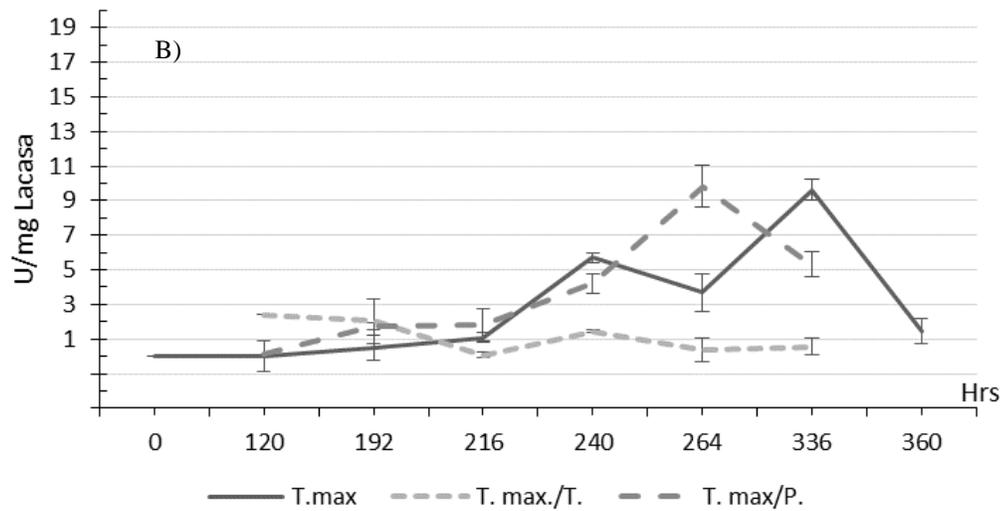
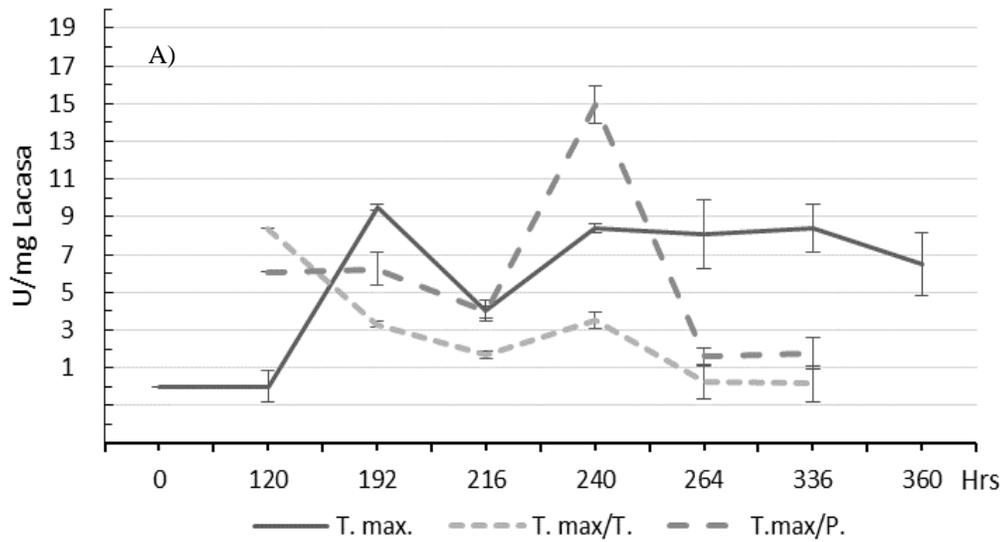


FIGURA 9.2.1.1: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA DE *T. MAXIMA* EN MEDIO LIGNINOLÍTICO Y NO LIGNINOLÍTICO. A) Actividad específica de lacasa de *T. maxima* en monocultivo y co-cultivo en condiciones no ligninolíticas B) Actividad específica de lacasa de *T. maxima* en monocultivo y co-cultivo en condiciones ligninolíticas. Clave: T. max: monocultivo de *T. maxima*, T.max/T: co-cultivo de *T. maxima* con *T. atroviride*, T max/P.:co-cultivo de *T. maxima* con *P. carneus*.

Sin embargo este resultado pudo deberse también al tipo de interacción con *Trichoderma atroviride*, por ejemplo en co-cultivo con *P. pulmonarius* y varias cepas de *Trichoderma sp.* la cepa de *Trichoderma atroviride* fue de las cepas menos agresivas y la que menos actividad de lacasa indujo, mientras que *Trichoderma viride*, medianamente agresivo, fue la cepa que mayor actividad enzimática indujo [Flores, 2009] sin embargo estos resultados son válidos para el caso del co-cultivo con el género *Pleurotus* [Flores, 2009] [Velázquez, 2005] y *Lentinula edodes* [Savoie, 1998] mientras que para el caso de los pocos reportes sobre los co-cultivos del género *Trametes sp.* con *Trichoderma sp.* los resultados de incremento en actividad enzimática presentan patrones diferentes; la cepa *T. versicolor* en co-cultivo con *Trichoderma harzianum* incrementa 48.8 veces su actividad de lacasa al segundo día en co-cultivo en medio no ligninolítico [Baldrian, 2004], lo que destaca que la variabilidad de resultados entre las interacciones no depende sólo de los géneros involucrados, si no del género y especie. Otro factor que pudo disminuir la respuesta de lacasa en co-cultivo con *T. atroviride* pudo ser por competición enzimática del sustrato, debido a que *T. atroviride* también produce lacasa extracelular. Con base en este resultado se seleccionó el co-cultivo de *T. maxima* con *P. carneus* para continuar con el procedimiento experimental, debido a que este micromiceto fue capaz de inducir un incremento en la actividad enzimática de *T. maxima*.

9.2.2.- OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LACASA EN CO-CULTIVO

En el diseño Plackett-Burman consultado, las concentraciones adecuadas para la actividad enzimática de lacasa fueron, 3.75 g/L de extracto de levadura, 1.5g/L de KH_2PO_4 , 0.075g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.75 de MgSO_4 , 0.015 g/L de CaCl_2 , 0.005g/L de FeSO_4 , 0.0005 g/L de MnSO_4 0.0005 g/L de ZnSO_4 , 0.0015 g/L de CuSO_4 y 2 discos de micelio agar como inóculo [Chancupul, 2014].

En el DCC se tomó como base esta formulación para optimizar la proporción C:N con los factores glucosa y sulfato de amonio, estos factores fueron evaluados a 2 niveles codificados como valor alto (+1), valor bajo (-1) y 3 puntos centrales(0) en 11 experimentos (corridas) (TABLA 9.2.2.1), este diseño se realizó tanto para el monocultivo de *T. maxima* como para su co-cultivo con *P. carneus* .

TABLA 9.2.2.1

MATRIZ DE DCC					
Corrida	C ₆ H ₁₂ O ₆	NH ₂ SO ₄	Glucosa (g/L)	NH ₂ SO ₄ (g/L)	C:N
1	-1	-1	30	0.075	10:0.31
2	-1	+1	30	0.125	10:0.32
3	+1	-1	50	0.075	10:0.19
4	+1	+1	50	0.125	10:0.17
5	-α	0	26	0.1	10:0.33
6	+α	0	54	0.1	10:0.18
7	0	-α	40	0.065	10: 0.23
8	0	+α	40	0.135	10:0.243
9	0	0	40	0.1	10:0.24
10	0	0	40	0.1	10:0.24
11	0	0	40	0.1	10: 0.24

La actividad específica de lacasa en co-cultivo fue mayor en la corrida con proporción C:N de 10:0.31 (FIGURA 9.2.2.1), mientras que para el monocultivo la mayor actividad específica se expresó en la corrida con proporción C:N de 10:0.19, una proporción 1.6 veces menor de carbono que la que requirió *T. maxima* en co-cultivo.

Las diferencias de requerimientos entre *T. maxima* en monocultivo y en co-cultivo se debieron a la interacción con el micromiceto *P.carneus* que aumenta la demanda de nitrógeno en el medio ya que este se consume más rápidamente que la glucosa, por ejemplo se ha reportado que mientras la glucosa decrece un 60% a las 168 horas el nitrógeno se consume en un 90% a las 48 horas [Keyser 1978] lo que justifica que en co-cultivo una mayor proporción de nitrógeno fue la óptima para que la actividad enzimática de *T. maxima* se indujera.

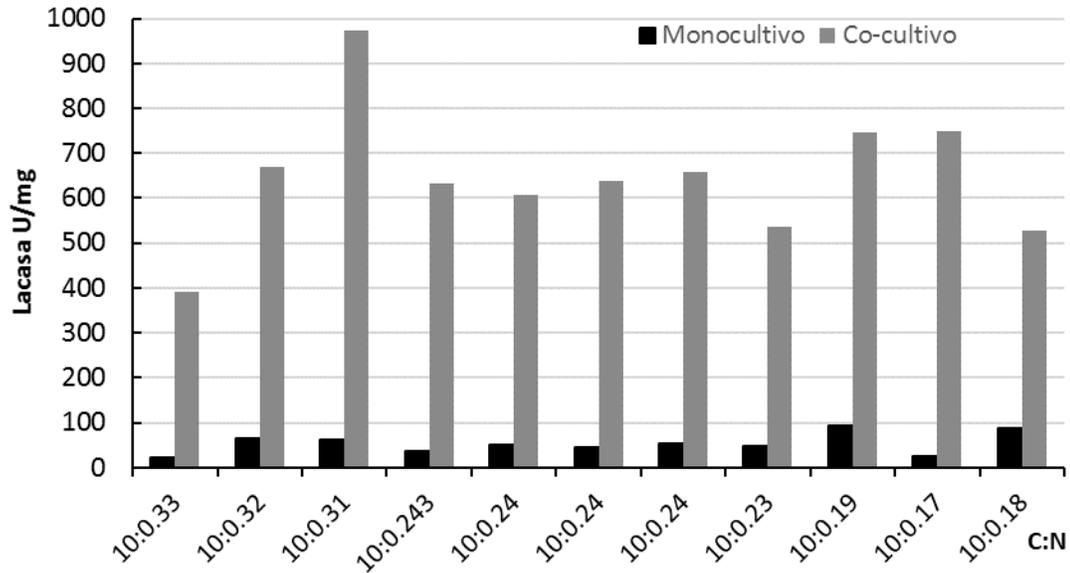


FIGURA 9.2.2.1: ACTIVIDAD DE LACASA EN RELACIÓN A PROPORCIÓN C:N. Actividad específica de lacasa de *T. maxima* en monocultivo (M) y en co-cultivo con *P. carneus* (CC) en relación a la proporción C:N de las corridas utilizadas para el DCC.

La máxima actividad de *T. maxima* en monocultivo fue de 94.118 U/mg a las 144 hr.. (6 días), mientras que la máxima actividad enzimática en co-cultivo fue de 972.99 U/mg a las 216 hr. (9 días), un incremento de 9.35 veces con respecto a la actividad enzimática de *T. maxima* en monocultivo (FIGURA 9.2.2.2 B) y un incremento de 60.81 veces con respecto al co-cultivo con *P. carneus* en medio no optimizado (FIGURA 7.2.2.1, Capítulo II).

Los resultados de actividad enzimática de lacasa medida cada de 24 hr. fueron analizados con el paquete estadístico STAT GRAPHYCS®, los análisis de datos correspondientes a cada día tuvieron un R^2 de 0.87 a 0.93 para el monocultivo de *T. maxima* y de 0.81 – 0.95 para el co-cultivo, sin embargo a las 216 horas (9 días), tiempo en el que se alcanzó la máxima actividad para la mayoría de las corridas, el valor de R^2 es de 0.57 y ninguno de los factores resultó significativo, sin embargo aunque los valores observados en general son mayores a los pronosticados todos los valores están dentro del intervalo de confianza con nivel de confianza del 95% (TABLA 9.2.2.3).

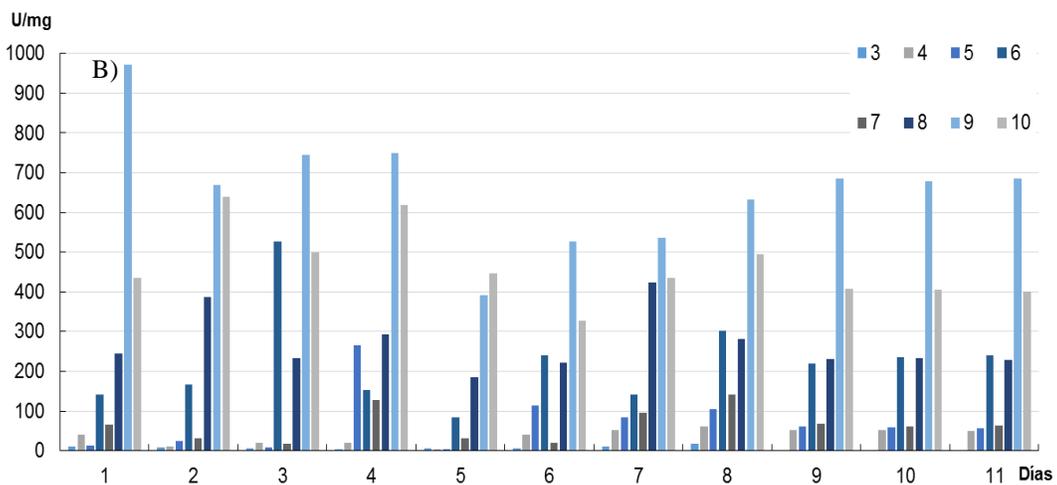
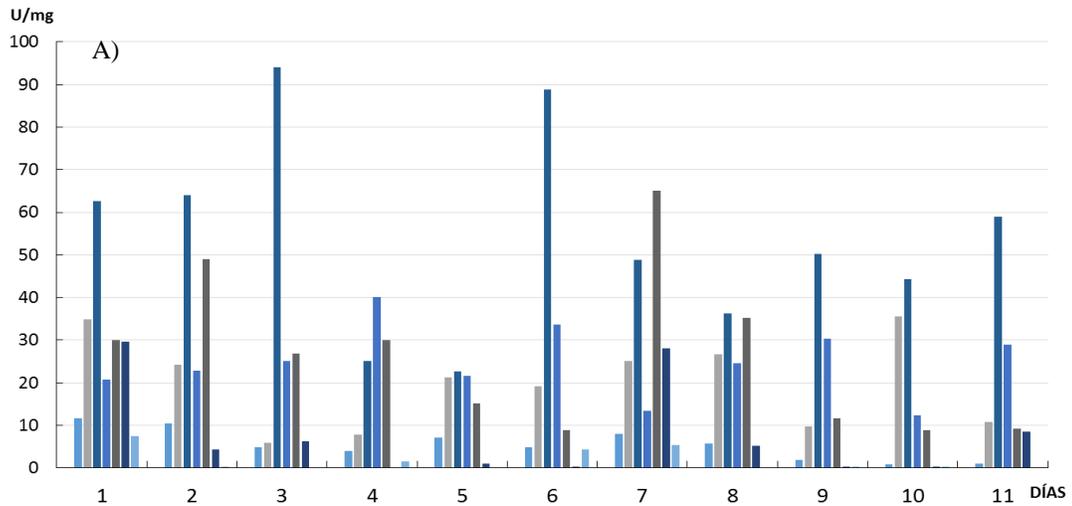


FIGURA 9.2.2.2: GRÁFICA DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LACASA EN CORRIDAS CON RESPECTO AL TIEMPO. En el eje de las "X" se muestran las corridas, las barras representan la actividad enzimática por día de A) Actividad específica de *T. maxima* en monocultivo y B) actividad específica de lacasa de *T. maxima* en co-cultivo.

No obstante se consideraron estos valores para seleccionar las características para el medio óptimo, que correspondió a la corrida No. 1 con una proporción C:N 10:0.31 , ya que el bajo valor de R^2 significa que el diseño ajustado es capaz de explicar el 57% de la variabilidad de actividad específica de lacasa, por lo que en co-cultivo la máxima respuesta no está estadísticamente relacionada con las concentraciones de carbono o nitrógeno, si no que la máxima actividad enzimática de lacasa está relacionada con los efectos producidos por *P. carneus* sobre el metabolismo *T. maxima* incluso esta tendencia se observó 24 hr. después de formado el co-cultivo con un estadístico de $R^2=0.67$, lo anterior se comprueba comparando dichos datos con el control (monocultivo de *T. maxima*) efecto que no ocurre en el monocultivo de *T. maxima* en donde a las 144 hr. tiempo en el que se registró la mayor actividad de lacasa el estadístico R^2 fue de 0.83 (VER ANEXO III) por lo que para *T. maxima* la actividad específica de lacasa está relacionada significativamente con los factores carbono y nitrógeno.

TABLA 9.2.2.2		
DESVIACIONES ESTÁNDAR DETERMINADAS CON PUNTOS CENTRALES		
Día	Promedio de actividad de lacasa [U/mg]	D.E.
Actividad de lacasa de <i>Trametes maxima</i> en monocultivo		
1	N.D.	-
3	1.248	0.586
4	18.676	14.597
5	23.876	9.920
6	54.527	8.924
7	9.913	1.539
10	3.057	4.757
11	0.239	0.110
Actividad de lacasa de <i>Trametes maxima</i> en co-cultivo		
3	1.141	0.618
4	52.268	1.194
5	59.3373	1.720
6	231.279	10.353
7	63.903	3.370
8	231.822	2.373
9	683.041	3.186
10	403.914	3.415

Desviación estándar determinada con los puntos centrales correspondientes a las corridas 9, 10 y 11.

Mientras que la actividad enzimática de lacasa se detectó tanto en monocultivo como en co-cultivo la actividad de MnP sólo fue detectable en co-cultivo (FIGURA 9.2.2.3), las actividades específicas mayores correspondieron a los 5 y 4 días, el máximo de actividad se registró en la corrida No.5, demostrándose que las peroxidasas requieren condiciones diferentes que las oxidasas para su inducción o para aumentar su actividad en el medio, aunque en este caso el factor más importante para la actividad de MnP fue la presencia de *P. carneus*, ya que a pesar de que en el medio inoculado con el monocultivo de *T. maxima* existía la misma formulación, no fue detectable la actividad de MnP. El crecimiento se estimó mediante la detección de proteína total mediante el método de Bradford [Bradford, 1976], siendo en las corridas con mayor proporción de carbono, por ejemplo la corrida 6, en donde se obtuvo la mayor concentración de proteína, mientras que en las corridas con concentraciones más bajas de carbono pero mayor proporción de nitrógeno las concentraciones de proteína fueron menores (FIGURA 9.2.2.4).

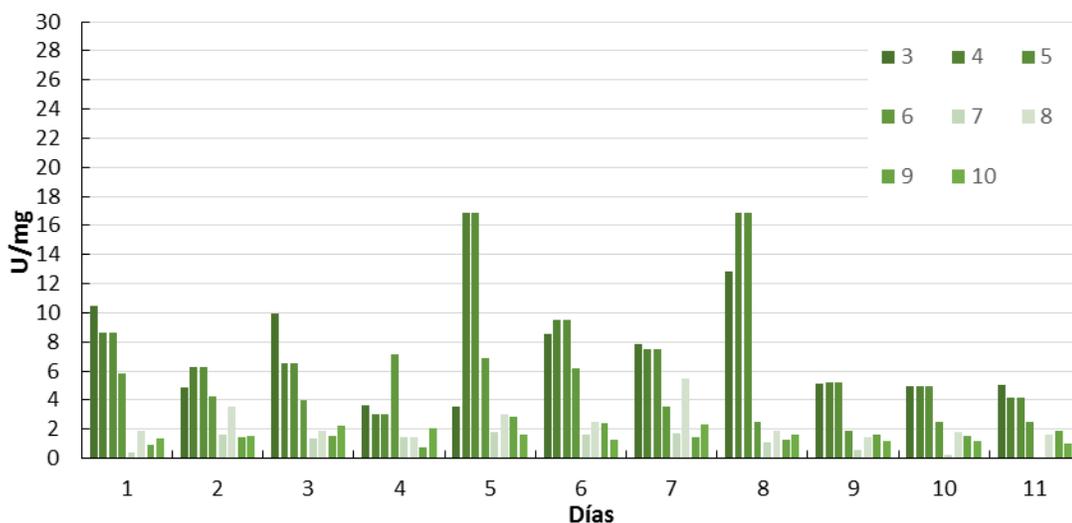


FIGURA 9.2.2.3: ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE MnP DE *Trametes maxima* EN CO-CULTIVO CORRESPONDIENTE A LAS CORRIDAS DEL DCC.

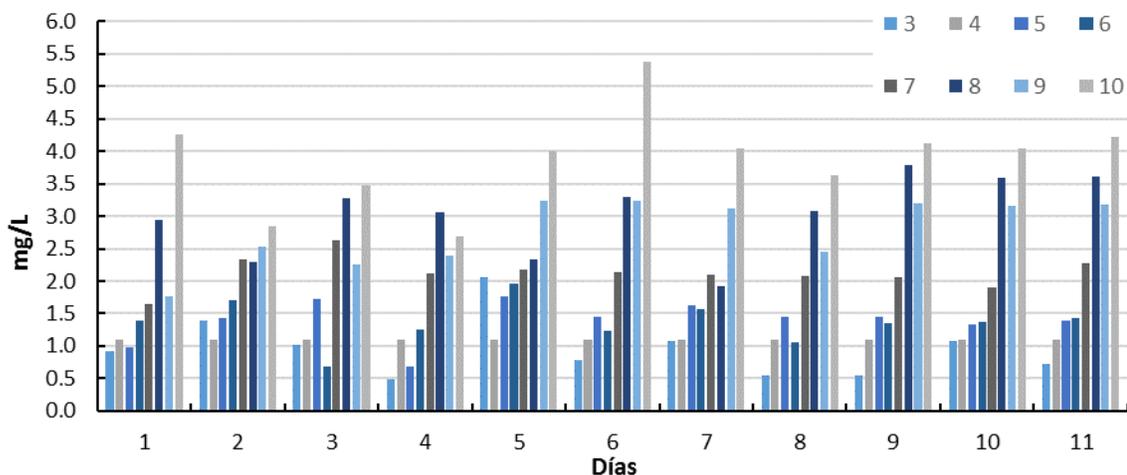


FIGURA 9.2.2.4: PROTEÍNA TOTAL EN CO-CULTIVO DE *T. maxima* Y *P. carneus* CORRESPONDIENTE A LAS CORRIDAS DEL DCC.

Con los resultados del análisis del DCC se concluyó mediante el gráfico de superficie respuesta que las condiciones óptimas para la actividad específica de lacasa fueron -1 de A y -1 de B (FIGURA 9.2.2.5 C), concordando con las condiciones de la corrida No. 1 en la que se propició la máxima actividad enzimática, por lo que esta formulación se seleccionó como medio óptimo. Los resultados gráficos demostraron que existe interacción entre los dos factores (FIGURA 9.2.2.5 B) además, según la ecuación del modelo ajustado [ECUACIÓN 9.2.2.1], la interacción (AB) fue el factor que mayor influencia tuvo en la respuesta de lacasa, con lo que se demuestra que la respuesta óptima de lacasa está significativamente regulada por la proporción C:N, no así por la concentración de la fuente de carbono o nitrógeno como factores separados ya que también se consideró el porcentaje de nitrógeno aportado por el extracto de levadura para determinar la proporción C:N, además el hecho de considerar sólo la glucosa tiene resultados variables, por ejemplo mientras se reportan altas actividades enzimáticas de lacasa (333 U/mL) de *T. pubescens* en medio con 40 g/L [Galhaup, 2005], en otros casos se reporta inhibición metabólica para basidiomicetos a esta concentración.

Sin embargo con base en la baja correlación del diseño al tiempo de la respuesta más alta de lacasa se concluyó que para este incremento la relación C:N fue significativa pero el factor más influyente fue la interacción con el micromiceto *P. carneus* y esta interacción tuvo un rol crítico en la inducción enzimática.

ECUACIÓN 9.2.2.1

$$Lacasa_{cc} = 606.573 + 5.79739 * Glucosa - 20.2775 * Nitrogeno - 8.31364 * Glucosa^2 + 77.4077 * Glucosa * Nitrogeno + 54.6312 * Nitrogeno^2$$

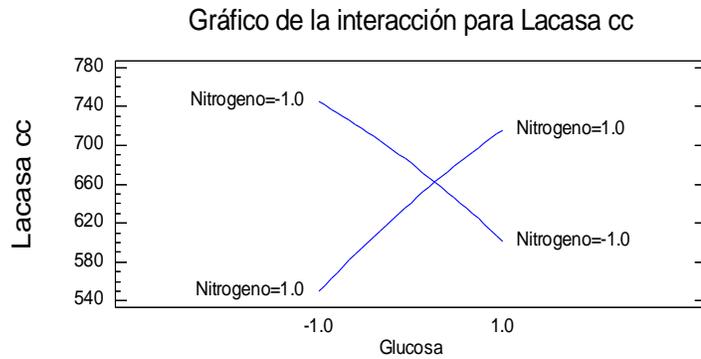
La baja actividad de MnP en el co-cultivo pudo deberse a la alta concentración de extracto de levadura, 3.75 g/L, concentración mayor a la reportada como óptima para la actividad de MnP de 2 g/L [Kamitsuji, 2005], aunque se ha reportado también que en *T. versicolor* no hay actividad de MnP cuando se cultiva en medio con glucosa como fuente de carbono, y dicha actividad sólo es cuantificable en presencia de sustratos lignocelulósicos [Schlosser, 1997].

TABLA: 9.2.2.3

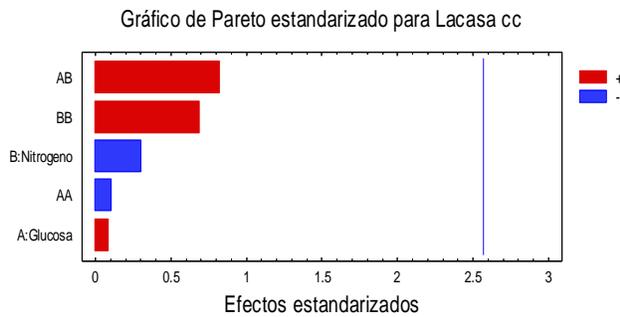
INTERVALOS DE CONFIANZA PARA VALORES DE ACTIVIDAD DE LACASA [u/mg] AL 9º DÍA

<i>Corrida</i>	Valores		L.C. 95%	
	Observado	Pronosticado	Inferior	Superior
1	745.116	601.557	220.373	982.742
2	749.898	715.818	334.634	1097.0
3	609.361	606.573	328.195	884.95
4	605.472	606.573	328.195	884.95
5	535.951	744.511	363.328	1125.69
6	390.74	581.747	200.563	962.931
7	972.991	744.778	363.594	1125.96
8	668.142	549.408	168.223	930.592
9	604.888	606.573	328.195	884.95
10	526.857	598.144	216.961	979.328
11	633.424	687.158	305.974	1068.34

A)



B)



C)

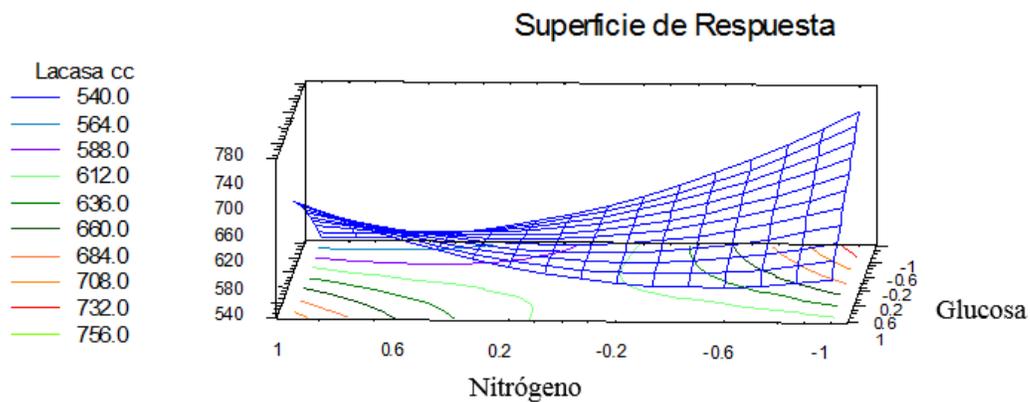


FIGURA 9.2.5: RESULTADOS GRÁFICOS DEL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL. A) gráfico de interacción, B) gráfico de Pareto en el que se muestra que los factores no tienen influencia significativa en la actividad específica de lacasa C) grafico superficie-respuesta.

9.2.3.- ACTIVIDAD DE PROTEASAS

La prueba cualitativa para proteasas neutras y alcalinas resultó negativa para todas las cepas de hongos evaluadas tanto en monocultivo como en co-cultivo debido a que no se detectó visualmente degradación de caseína en agar (FIGURA 9.2.3.1) que se manifiesta como un halo translúcido alrededor del papel filtro impregnado. Este resultado demostró que la disminución de la actividad enzimática no ocurre por proteasas neutras o alcalinas ya que ninguno de los micromicetos evaluados las produce en estas condiciones, sin embargo si se hubiesen detectado proteasas alcalinas o ácidas de *P. carneus* pudiese ser conveniente para la actividad de lacasa ya que existen reportes de que la cepa *P. carneus* es productora de una paecilopeptina inhibidora de catepsina S (EC 3.4.22.27), una cisteinproteasa altamente activa perteneciente a la superfamilia de la papaína, la paecilopeptina tiene la capacidad de inhibir también a otras proteasas [Shindo 2002].

En las pruebas para cuantificación de proteasas ácidas, los resultados fueron negativos para *Trametes máxima*, *P. carneus*, co-cultivo de *T. maxima* con *P. carneus* y para *T. atroviride* en monocultivo, no así para el caso de *T. atroviride* en co-cultivo con *T. maxima*, en donde al 6^º día de inoculación del micromiceto se registró una actividad de 0.45 U/mg de proteasas ácidas, la actividad registrada no fue alta debido a que el pH óptimo para el sistema proteolítico de *T. atroviride* es de 6 [Rodríguez-Kabana 1978] mientras que el pH del medio es de 4.5, pero fue suficiente para provocar una disminución significativa en la actividad de lacasa. A diferencia de *P. carneus* el género *Trichoderma sp.* se caracterizan por su producción de proteasas, incluso esta propiedad se aprovecha en biocontrol de hongos patógenos para las plantas y nematodos, esta aplicación biotecnológica se utiliza desde 1969 [Rodríguez-Kabana, 1969], como ejemplo, se sabe que *T. harzianum* produce proteasas que inactivan enzimas hidrolíticas producidas por *B. cinerea* en las hojas de la planta de frijol [Kapat 1999].

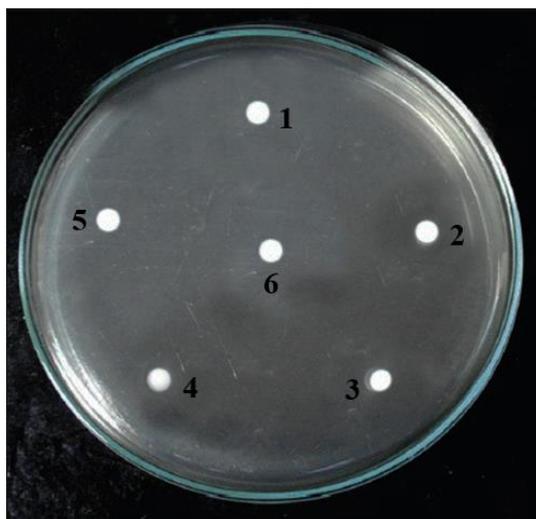


FIGURA 9.2.3.1: ANÁLISIS CUALITATIVO DE PROTEASAS NEUTRAS Y ALCALINAS DESPUÉS DE 48HR. El extracto enzimático en discos de papel filtro corresponde a 1= *T. maxima*, 2 = *P. carneus*, 3= *T. atroviride*, 4= co-cultivo *T. maxima* con *P. carneus* 5= Co-cultivo *T. maxima* con *T. atroviride*, 6 = control con medio de cultivo estéril.

La proteasa más predominante tanto en *T. atroviride* como en *T. harzianum* es la serinproteasa (EC. 3.4.21) tipo tripsina [Uchikoba, 2001] que posee un residuo de serina en su sitio activo, la mayoría de estas proteasas son activas a pH alcalino, aunque algunas son activas a pH ácido y son de bajo peso molecular (25kDa), su punto isoeléctrico se encuentra entre 4.4 y 6 [Kredics , 2005] por lo que la actividad de proteasa cuantificada probablemente pertenezca a este tipo de proteasa ya que es la más común. El medio de cultivo también ejerció efectos considerables, no sólo en la actividad de proteasas, sino también en la producción de estas enzimas, por ejemplo en el caso de *T. harzianum*, que presenta algunas similitudes con *T. atroviride* las proteasas ácidas son inducidas por fuentes de nitrógeno como extracto de levadura, caseína y peptona mientras que las proteasas alcalinas son inducidas por disminución en la concentración de fuentes de carbono [Delgado-Jarana, 2000], por lo que debido a las condiciones del medio el co-cultivo de *T. maxima* con *T. atroviride* que contiene extracto de levadura, no aumenta la actividad enzimática de lacasa, por el contrario, esta actividad enzimática disminuyó debido a la presencia de proteasas inducidas en *T. atroviride* que tuvieron como probable sustrato a las lacasas, mientras que *P. carneus*, al no tener ninguna actividad proteolítica detectable permitió la actividad de lacasa y de otras enzimas en el medio de cultivo.

9.2.4.- FORMA DEL INÓCULO

El experimento se llevó a cabo en medio con formulación óptima para la actividad enzimática de lacasa del *T. maxima* en co-cultivo. La variable fue la manera en la que se inoculó *P. carneus*. Cuando *P. carneus* fue inoculado con solución de esporas la actividad de lacasa de *T. maxima* fue de 659.53 U/mg, significativamente menor ($p=0.0006$) que la actividad enzimática en el medio inoculado con discos micelio-agar que fue de 949.75 U/mg, este resultado coincidió con otros reportados [Dekker, 2007]. En cuanto a la actividad enzimática de lacasa del medio inoculado con discos micelio agar comparada con la corrida con máxima actividad de DCC no se registraron diferencias significativas ($p=0.007$), lo que confirma la reproducibilidad del experimento.

CAPÍTULO IV

10.- REMOCIÓN DE ATRAZINA

10.1.- METODOLOGÍA

10.1.1.- REMOCIÓN CON EXTRACTO ENZIMÁTICO

Existen varios reportes en los que se demuestra que la atrazina puede ser degradada e incluso mineralizada por acción de Basidiomicetos, sin embargo el mecanismo mediante el cual se remueve este contaminante aún no está totalmente esclarecido, aunque la mayoría de las veces la degradación de atrazina se atribuye a enzimas ligninolíticas extracelulares como la lacasa [Pereira M., 2013] [Gorotova, 2005][Mougín y Ashther, 1996][Masaphy, 1993].

Se inoculó el co-cultivo en medio con condiciones óptimas para la actividad enzimática de lacasa obtenidas del DCC y al 9º día (máxima actividad enzimática) el medio de cultivo gastado fue extraído y esterilizado por filtración con membranas de 0.22µm. 10 mL de medio de cultivo y se colocaron por triplicado en viales ámbar de 20 mL, a cada vial se le adicionó atrazina en concentraciones de 1, 5, 10 y 20ppm en 5 µL de acetona grado HPLC [Rodakiewicz-Nowak, 2000] puesto que a diferencia de otros solventes, como el etanol, la acetona no afecta ni modifica la actividad enzimática de lacasa [Wan, 2010] [Yun-Yang, 2012] Los experimentos se hicieron por triplicado para cada uno de los cultivos contando con controles de remoción cuyo medio de reacción consistió en 10 mL de medio hervido durante 5 minutos para desnaturalizar la lacasa y 20 ppm de atrazina, los viales fueron incubados en oscuridad a 25°C a 120 rpm; la remoción de atrazina fue evaluada al 1º, 3º y 5º día mediante la extracción de alícuotas de 1ml a dichos tiempos.

Para extraer la atrazina del medio a cada una de las muestras se le adicionó NaCl hasta el punto de “Salting out” seguido de la adición de 8µl de NaOH 0.5M para modificar el pH del medio a 8 (pH inicial del medio = 5), de esta manera se evitó la forma protonada de la atrazina (FIGURA 10.1.1.1) disminuyendo las interacciones del herbicida con compuestos del medio de cultivo, posteriormente se extrajo con 200µl de acetato de etilo, esta última etapa se repitió 5 veces hasta obtener la atrazina extraída en 1 mL de acetato de etilo.

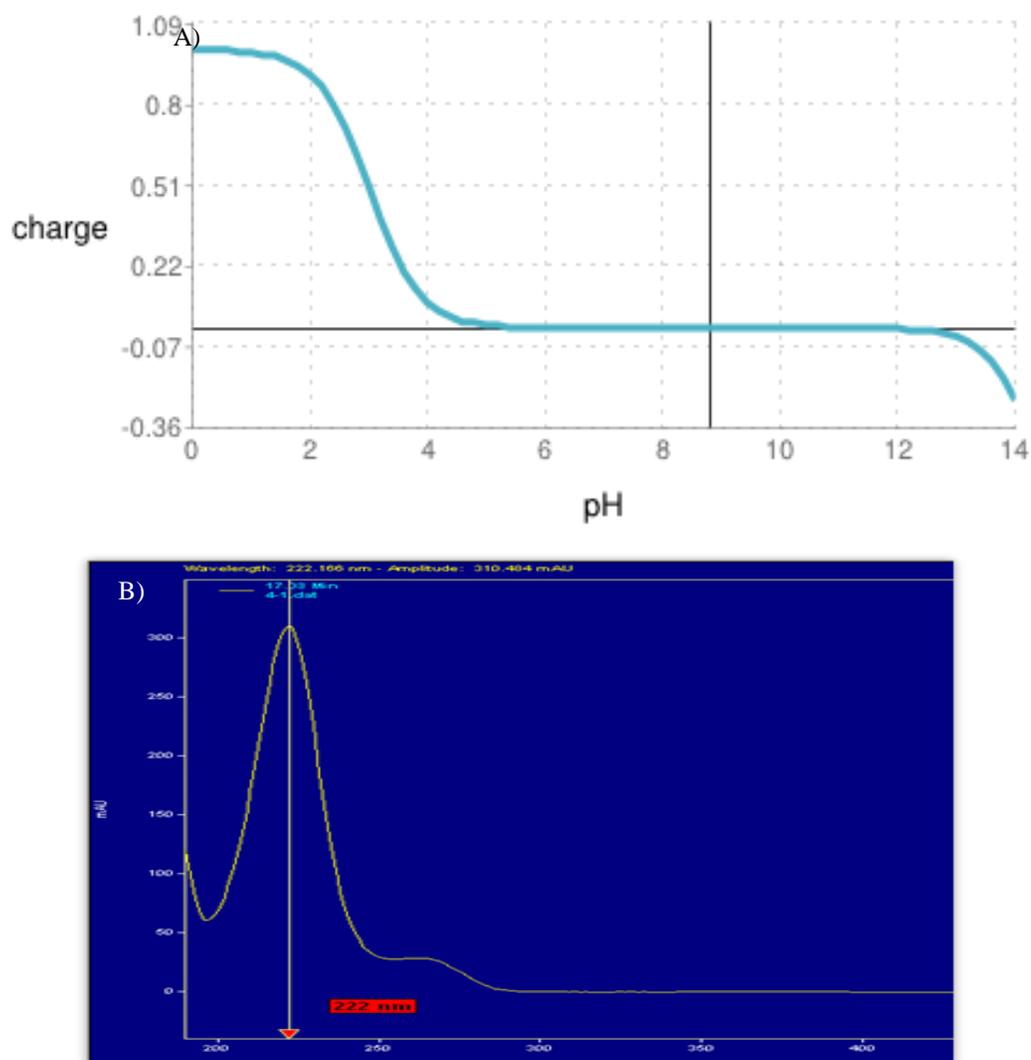
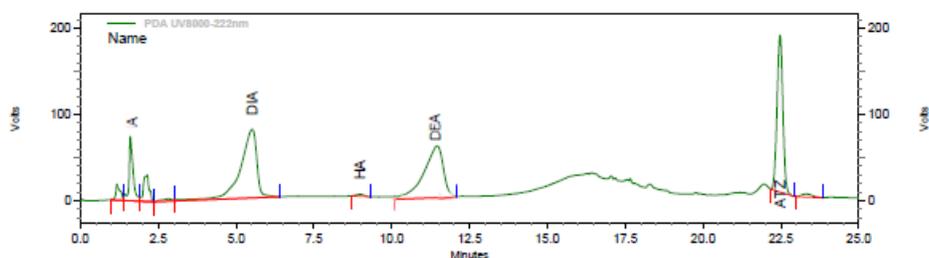


FIGURA 10.1.1.1: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ATRAZINA. A). Punto isoelectrico de atrazina [Chem Spider]. B) Máxima absorbancia para atrazina (222nm) determinada por arreglo HPLC fotodiodo SpectraSystem UV 8000.

Las muestras fueron evaporadas al vacío en SpeedVac Eppendorf Concentrator 5301® durante 20 minutos, posteriormente fueron resuspendidas en 1 mL de acetonitrilo grado HPLC, la concentración de atrazina fue medida en HPLC Thermo Scientific acoplado a un detector de arreglo de diodos (SpectraSystem UV 8000), automuestreador (SpectraSystem AS3000) y bomba (SpectraSystem P4000) equipado con una columna Restek ultra C18 (5 μm x150mm x 4.6 mm). La columna fue operada a 25°C a un flujo de 0.6 mL/min, volumen de inyección 20 μL . La fase móvil consistió en un sistema en gradiente lineal Acetonitrilo: Agua, 30:70 de 0-5 min., 45:55 de 5-15 min. y 50:50 de 15-20 min.; la longitud de onda para la cuantificación de atrazina fue de 222 nm. La curva de calibración de atrazina fue realizada con estándares de 0.25, 0.5, 2, 4, 6, 10 y 20 ppm (ANEXO II) con un valor de $R^2 = 0.98$

Para cuantificar los metabolitos la fase móvil consistió en un sistema en gradiente lineal Acetonitrilo: Buffer fosfatos pH 7, 20: 80 de 0-10 min., 45:55 de 10-20 min. y 20:80 de 20-25 min. [Da-Cunha, 2012][Vermuelen, 1982] a un flujo de 0.8 mL/min; la absorbancia promedio de los metabolitos es de 220 nm, por lo que se midieron con la longitud de onda previamente seleccionada, 222 nm. La curva de calibración para metabolitos se realizó en Mix (FIGURA 10.1.1.2) con los metabolitos ácido cianúrico (1,3,5-triazina-2,4,6-triol) $R^2= 0.9915$, hidroxiatrazina (2-Hidroxy-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) $R^2= 0.969$, deisopropil-atrazina (6-Cloro-N-ethyl-1,3,5-triazina-2,4-diamina) $R^2=0.9987$ Mdesetil-atrazina (2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) $R^2=0.9866$ y atrazina (2-cloro-4-(etilamina)-6-(isopropilamina)-s-triazina,) $R^2=0.9988$ (VER ANEXO II), sin embargo, pese a la linealidad, la señal de algunos metabolitos como la hidroxiatrazina y DEA no fue detectada en concentraciones menores a 1ppm.



PDA
 UV8000-222nm
 Results (System
 01/05/2015
 11:58:14 a.m.)
 (Original))

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
	Ac. Cianurico			0.000 BDL
5	DIA	5.517	2894724	2.000 CAL
6	HA	8.980	38732	2.000 CAL
7	DEA	11.072	2221548	2.000 CAL
8	ATZ	22.472	2361504	2.000 CAL

FIGURA 10.1.1.2: CROMATOGRAMA DE METABOLITOS DE ATRAZINA. Ácido cianúrico, [HA] hidroxiatrazina, [DIA] Deisopropil-atrazina, [DEA] desetil-atrazina y [ATZ] atrazina.

10.1.2.- REMOCIÓN CON CONCENTRADO DE LACASA

La concentración enzimática del co-cultivo correspondió a 0.97 U/mg de lacasa por mililitro, para determinar la relación que existe entre la actividad de lacas y la remoción de atrazina los 250 mL de medio gastado del co-cultivo, monocultivo de *T. maxima* y monocultivo de *P. carneus* fueron concentrados por filtración y centrifugación en tubos AMICON® 10,000 MWCO (10 KDa) a 4°C y 3500 rpm durante 20 minutos hasta concentrar el medio en un volumen final de 45 mL (TABLA 10.1.2.1), con una concentración 10mM de PMSF Sigma-Aldrich como inhibidor de proteasas.

Al medio concentrado se le cuantificó la proteína total y la actividad de lacasa que fueron concentradas 5.5 veces y 11.7 veces respectivamente con respecto al medio de referencia, a esta concentración la actividad específica de lacasa por mL fue de 11.39 U/mg.

TABLA 10.1.2.1

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS		
	Proteína [mg]	Lacasa [U/mg]
Co-cultivo	23.129 ±0.001	512.658 ±1.15
<i>T. maxima</i>	21.384 ±0.0009	82.27 ±0.32
<i>P. carneus</i>	3.675 ±0.003	N.D.

Las unidades experimentales para evaluar la remoción de atrazina consistieron en 1 mL de reacción en viales ambar de 5 mL con 5 ppm de atrazina adicionada en 5 µl de acetona grado HPLC, debido a la volatilización de este disolvente el volumen empleado no se consideró para el volumen de reacción. La proteína concentrada del co-cultivo se ajustó a 9.11 y 6.83 U/mg de Lacasa por mL diluyendo con buffer acetatos pH 4.5, dicho factor de dilución fue empleado para ajustar las concentraciones de proteína de *T. maxima* a 0.37 y 0.282 mg por mL. y a la proteína de *P. carneus*.

Las diluciones se hicieron por triplicado para cada uno de los cultivos contando con controles abióticos con 1 mL de buffer pH 4.5 y 5 ppm de atrazina y controles de pH a los que no se les adicionó NaOH.

La remoción de atrazina fue evaluada a las 24 (1 día) y 120 (5 días) horas. Para la extracción se utilizó el método de acetato de etilo descrito anteriormente pero a diferencia del protocolo anterior, debido a la solución amortiguadora presente se adicionaron 13 µl de NaOH 0.5M para ajustar el pH del medio a 8 y NaCl hasta el punto de "salting out" seguido de 5 extracciones con 200µl de acetato de etilo. Las muestras fueron evaporadas al vacío en SpeedVac Eppendorf Concentrator 5301® durante 20 minutos, posteriormente fueron resuspendidas en 1 mL de acetonitrilo grado HPLC.

10.1.3.- REMOCIÓN CON LACASA COMERCIAL

De los basidiomicetos en general el género *Trametes sp.* es el que produce las isoformas de lacasa con mayores potenciales redox, sin embargo es poca la bibliografía sobre isoformas de lacasas de las diferentes especies de *Trametes sp.* siendo las lacasas *Trametes versicolor* las más estudiadas y caracterizadas y las de mayor potencial redox y debido a la falta de datos sobre el potencial redox de lacasa de *T. maxima* se empleó como referencia liofilizado de lacasa comercial Sigma-Aldrich® de *Trametes versicolor*.

Aunque existen reportes de la influencia de metales en los hongos basidiomicetos para la producción de lacasa, no hay reportes que expliquen la influencia de metales como el cobre en la actividad de lacasa *in vitro* que en teoría pueden cooperar con la transferencia de electrones y así actuar como catalizadores de la reacción enzimática.

Para evaluar los efectos de los metales sobre la lacasa de *T. versicolor* y su influencia en la degradación de atrazina, se evaluó dicha degradación en 1 ml de reacción con 5 ppm de atrazina y 10 U/mg de lacasa de *T. versicolor* disuelta en buffer de acetatos pH= 4.5 en viales ambar de 5 mL con 3 condiciones; la primera con una solución de 0.75 de $MgSO_4$, 0.005g/L de $FeSO_4$, 0.0005, g/L de $MnSO_4$, 0.0005 g/L de $ZnSO_4$ y 0.0015 g/L de $CuSO_4$, la segunda con una concentración de 0.003 g/L de $CuSO_4$ y la tercera con solamente buffer, así como el control de remoción abiótica con 5ppm de atrazina en buffer sin enzima, todas las condiciones se hicieron por triplicado.

Las muestras se incubaron durante 120 horas a $25\pm 1^\circ C$ a 120 rpm, tiempo al que se extrajo la atrazina con adición de NaCl hasta el punto de "Salting out" seguido de la adición de 8µl de NaOH 0.5M para modificar el pH del medio a 8; posteriormente se extrajo con 200µl de acetato de etilo, esta última etapa se repitió 5 veces hasta obtener la atrazina extraída en 1 mL de acetato de etilo. Las muestras fueron evaporadas al vacío en *SpeedVac Eppendorf Concentrator 5301®* durante 20 minutos, posteriormente fueron resuspendidas en 1 mL de acetonitrilo grado HPLC.

10.2.- RESULTADOS

10.2.1.- REMOCIÓN CON EXTRACTO ENZIMÁTICO

La eficiencia de extracción con acetato de etilo fue de 93%, este valor fue tomado en cuenta al final de la cuantificación. Al primer día no se registró remoción significativa de atrazina, sólo a partir de los 3 días se observó remoción no sólo en las unidades con actividad enzimática y 1ppm, si no también en el control de remoción (Tabla 10.2.1.1) por lo que este factor de corrección se aplicó al final de la cuantificación. Al 5º día se observó remoción en unidades con 1 y 5 ppm , en las unidades con 10 y 20 ppm se observó sólo una remoción promedio del 10%, muy similar al porcentaje de pérdida de atrazina en el control abiótico (9.13%) por lo que la concentración de lacasa en el medio gastado no fue suficiente para remover concentraciones mayores a 5ppm de atrazina.

El mayor porcentaje de remoción se registró en unidades con 1 ppm entre los días 1 a 3 y 3 a 5, aunque hubo una disminución de un 12.67% con respecto al tiempo.

TABLA 10.2.1.1

REMOCIÓN DE ATRAZINA CON RESPECTO AL TIEMPO DE INCUBACIÓN							
	C1	Remoción D1	C3	Remoción D3	C5	Remoción D5	Total (%)
	ppm	%	Ppm	%	ppm	%	
Control abiótico	21.38	0.1	19.66	7.93	19.41	1.20	9.13
1 ppm	1.33	ND	0.83	37.74	0.62	25.07	62.81
5ppm	5.37	ND	5.21	3.11	3.63	33.73	36.84
10ppm	12.81	ND	12.24	5.10	11.10	9.80	14.90
20ppm	21.94	ND	21.37	2.73	18.82	11.75	14.48

Clave: C1) concentración al día 1 C3) concentración al día 3 C5) concentración al 5º día. D1) remoción al día 1. D3) Remoción al día 3 y D5) remoción al día 5

Los tiempos establecidos para evaluar la remoción de atrazina se basaron tomando en cuenta los antecedentes de reacciones *in vitro* de lacasa [Collins, 1996] [Guillén, 2000] y del tiempo de remoción en medio de cultivo con el fin de tener un parámetro de comparación ya que no existen antecedentes bibliográficos de remoción de atrazina por lacasa *in vitro*. Para la identificación de metabolitos el medio de reacción sobrante fue filtrado y concentrado en cartuchos *SPE Superclean ENVI-18*, el contenido fue eluído con 1mL de acetonitrilo, estas muestras fueron cuantificadas en HPLC con la metodología descrita para metabolitos, sin embargo no se identificó la presencia de metabolitos, por lo que no se comprobó que la remoción de atrazina se debiera a biodegradación.

Debido a que se registró remoción y no hubo metabolitos detectables se consideró la posibilidad de que la atrazina formó aductos con las proteínas del medio gastado, por lo que se realizó una isoterma de adsorción con los datos de atrazina y la concentración de proteína correspondiente a 4.5mg/mL con el programa estadístico Origin®. Los datos ajustaron a un modelo de Langmuir ($R^2 = 0.885$) (FIGURA 10.2.1.1), obteniéndose una $qm = 0.88$, sin embargo debido a que las concentraciones empleadas de atrazina y el tiempo de la incubación correspondiente a 5 días no fueron suficientes para que el sistema alcanzara el equilibrio, se refiere C_e como C_{5d} debido a que el experimento no fue diseñado con el fin de ajustarse a una isoterma.

El hecho de que la adsorción fuera evaluada antes de alcanzar el equilibrio sugiere que el valor de qm pudiese ser aún mayor e incluso alcanzar una relación de 1:1 entre moléculas de proteína y moléculas de atrazina.

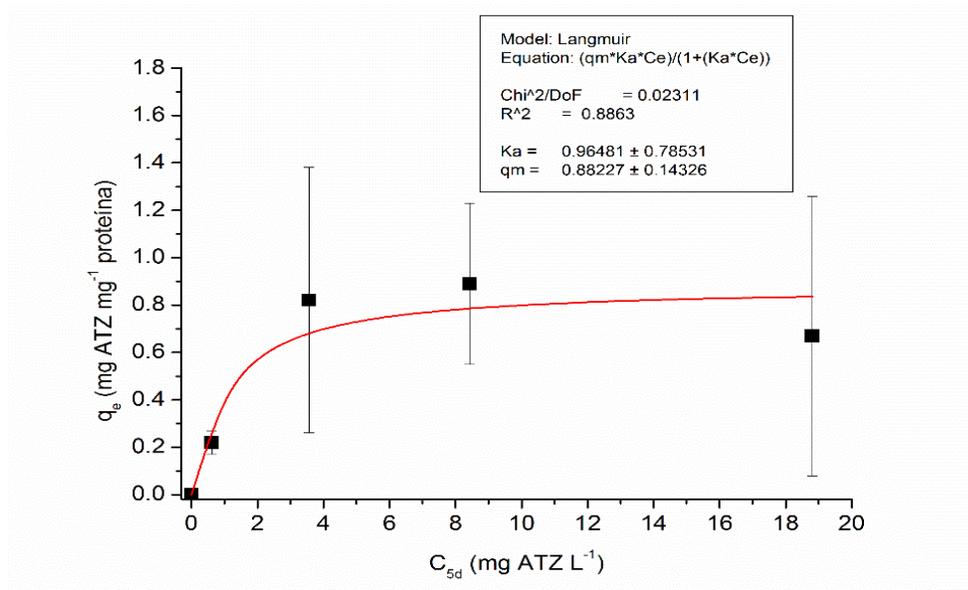


FIGURA 10.1.2.1: GRÁFICO DE ISOTERMA DE LANGMUIR DE Q_E VS C_{D5}

10.2.2.- REMOCIÓN CON CONCENTRADO DE LACASA

De los controles abióticos se recuperaron 5.5 (110%), 6.0 (120%) y 5.2 (104%) ppm, por lo que el porcentaje promedio de recuperación fue de 111.3%, este valor fue considerado al final de la cuantificación. En los controles de pH a los que no se les adicionó NaOH para extraer la atrazina el porcentaje de recuperación fue de 0.01% (0.2ppm) (FIGURA 10.2.2.1 A) esto sugiere que la atrazina puede estar formando aductos con las proteínas, en especial las que tiene residuos de cisteína [Doodley-Prenni, 2006] debido a que a pH <8 la atrazina posee carga positiva, además de que al poseer carga es menos soluble en el acetato de etilo, esta pérdida en la concentración de atrazina no se atribuye a biodegradación ya que no hay presencia de otros picos del medio con tiempos de retención similares al control lo que indica una extracción deficiente y a que este efecto sólo se observó en el triplicado correspondiente al control de pH.

Además este efecto sólo se observa en las muestras que fueron incubadas con proteína concentrada ya que en los controles conformados solo por 1 ml de buffer acetatos con 5ppm de atrazina que no se ajustaron a un pH=8 la eficiencia de extracción fue del 115%, (FIGURA 10.2.2.1 B) esto pudo deberse a que en los controles no había proteínas del medio gastado que pudieron interactuar con la atrazina.

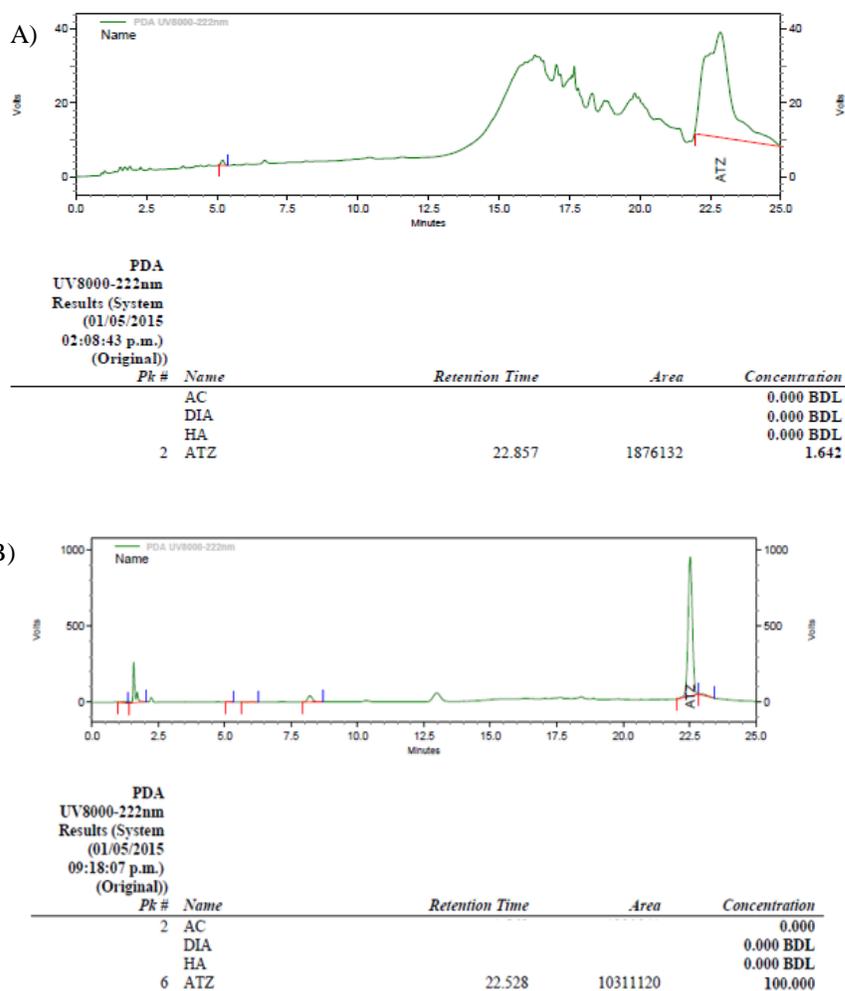


FIGURA 10.2.2: CROMATOGRAMAS DE ATRAZINA EXTRAÍDA DE CONCENTRADO DE LACASA
 .A) Se muestra extracción en medio con pH ácido donde se muestra la ausencia de los picos con tiempos de retención correspondientes al control de medio de reacción sin atrazina. B) En formato de Normalización, extracción de controles con Buffer y atrazina, en el que el 100% del área de los picos calibrados del cromatograma corresponde a atrazina.

A las 24 horas no se presentó remoción de atrazina en ninguno de los extractos de proteína concentrada a los que se les ajustó el pH a 7 y aunque se detectaron varios picos en el cromatograma ninguno de ellos correspondió con los tiempos de retención respectivos a los metabolitos por lo que se deduce que estos no están presentes y que no hay degradación de atrazina a este tiempo.

Después de 5 días no se registró remoción en las 6 condiciones distintas (FIGURA 10.2.2.2), extracto enzimático de co-cultivo con 2 concentraciones, extracto de *T. maxima* con mayor y menor concentración y extracto de *P. carneus* con mayor y menor concentración proteica. La única diferencia que se observa entre los cromatogramas es la concentración de elementos del medio gastado (λ_{max} 209nm) con tiempo de retención de 2.2 min. estos picos presentaron mayor absorbancia en el medio del co-cultivo (316 mAU), menor en el medio de *T. maxima* (248mAU), el medio que reportó una menor absorbancia de estos elementos fue el extraído de *P. carneus*. (221.5 mAU).

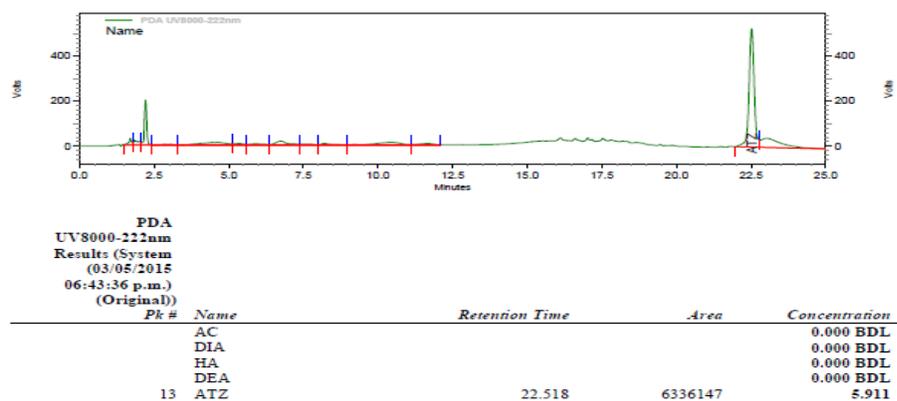


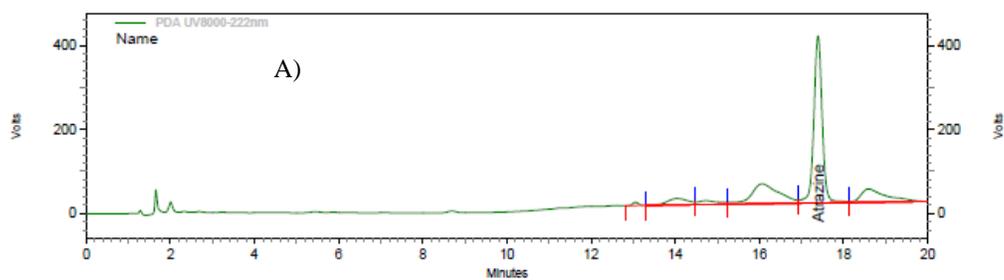
FIGURA 10.2.2.2: MUESTRA ANALIZADA EN HPLC CON GRADIENTE ACETONITRILIO-BUFFER PARA DETECCIÓN DE METABOLITOS.

10.2.3.- REMOCIÓN CON LACASA COMERCIAL

En cuanto a los resultados obtenidos con lacasa comercial de *T. versicolor* no se registró remoción en la condición con metales ni en la condición sin inductores enzimáticos (FIGURA 10.2.3.1 A) en la que sólo se tenía lacasa y buffer acetatos pH 4.5. En cuanto a la presencia de metales se demostró que la presencia de estos en el medio de cultivo no influye en la actividad enzimática de lacasa, sólo en la producción de la misma, es decir, su efecto se limita a la respuesta celular de los hongos en co-cultivo. En cuanto a la condición en la que se empleó el doble de la concentración de cobre en comparación con la solución con metales se obtuvo una remoción promedio del 9% en comparación con el control abiótico (FIGURA 10.2.3.1 B) y a pesar de que es un porcentaje muy bajo de remoción fue mayor a los obtenidos en extracto enzimático concentrado, lo que sugirió que concentraciones mayores de cobre puedan tener un efecto en la actividad catalítica de la lacasa y no sólo un efecto celular en la producción de la enzima.

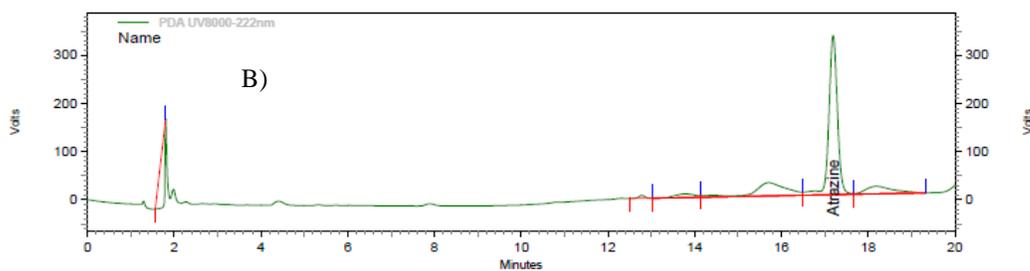
Sin embargo, a pesar de la remoción obtenida en presencia de cobre, la atrazina no se clasifica como un sustrato para la lacasa debido a que no se registró presencia de algún metabolito que indicara que la atrazina fue degradada y no solo removida por alguna interacción con componentes del medio de reacción, aunado a lo anterior, las reacciones enzimáticas se definen como reacciones catalizadas y el periodo reacción entre esta molécula y la enzima es demasiado lento en comparación con las reacciones con otros compuestos que sí se han clasificado como sustratos para la lacasa como por ejemplo los polifenoles, que son degradados por la lacasa en menos de 24 horas sin necesidad de inductores.

Los resultados sugieren que el potencial redox de lacasa de *T. maxima* sea igual o menor que el de *T. versicolor* pero no mayor, debido a que en las mismas condiciones las enzimas de las dos especies mostraron resultados similares, si bien la lacasa de *T. versicolor* redujo la concentración de atrazina un 9% fue por acción del cobre añadido, condición que no se evaluó con la lacasa de *T. maxima* debido a que esta enzima no fue purificada del medio.



PDA
UV8000-222nm
Results (System
(08/07/2015
02:02:34 p.m.)
(Original))

<i>Pk #</i>	<i>Name</i>	<i>Retention Time</i>	<i>Area</i>	<i>Concentration</i>
5	Atrazine	17.392	5528993	5.125



PDA
UV8000-222nm
Results (System
(08/07/2015
02:26:13 p.m.)
(Original))

<i>Pk #</i>	<i>Name</i>	<i>Retention Time</i>	<i>Area</i>	<i>Concentration</i>
5	Atrazine	17.192	4558755	4.226

FIGURA 10.2.3.1: CROMATOGRAMA DE ATRAZINA EXTRAÍDA DE SOLUCIÓN DE LACASA COMERCIAL. A) Cromatograma de atrazina incubada en solución con metales y lacasa B): Cromatograma de atrazina incubada en solución con 0.003 g/L de cobre y lacasa en donde se muestra una disminución en la concentración de atrazina.

11.- DISCUSIÓN

Las tecnologías para biorremediación enfocadas en la solución de problemas ambientales no son emergentes ni recientes pues existen desde hace más de una década, sin embargo aún requieren de investigación para desarrollarse al punto de que puedan convertirse en tecnologías aplicables, aunado a lo anterior, debido a su diversidad son pocas las características que comparten en común dichas tecnologías entre sí, por lo que cada caso en particular requiere de la adecuación de sus características a circunstancias particulares lo que dificulta aún más su aplicación. Proponer métodos innovadores para la solución de problemas ambientales requiere de una profunda investigación para garantizar que estas alternativas presentan una ventaja real y verdadera con respecto a las existentes.

En lo que compete a los resultados de esta investigación, demostraron que se puede garantizar que la respuesta enzimática del basidiomiceto *Trametes maxima* incrementa siempre que se confronte en co-cultivo con *Paecllomyces carneuns*, por lo que en el medio ambiente en el que las condiciones climáticas lo permitan será posible obtener dicha respuesta. Generalmente la biorremediación por microorganismos en suelo se hace mediante consorcios que incluyen a varias especies, la mayoría de ellas originarias del sitio impactado [Reátegui, 2012] [Govantes, 2009] de esta manera las interacciones son más estables además la presencia de bacterias acelera los procesos catabólicos de xenobióticos debido a que en comparación su crecimiento es más rápido por lo que son más competitivas a diferencia de los hongos aunque se ha reportado que ciertas bacterias en co-cultivo con *T. versicolor* como *E. magnussi*, *B. subtilis* y *E. coli* incrementan la actividad de lacasa de este basidiomiceto pero siempre en menor medida que lo que la logran incrementar los hongos micromicetos [Baldrian 2004]. En un consorcio la respuesta no está definida por la interacción con una sola especie, a diferencia del co-cultivo en donde la respuesta de un hongo depende directamente de otro, mientras que los demás factores tienen una influencia descartable.

A pesar de que las cepas de *T. maxima* y *P. carneus* fueron aisladas en Actopan, Veracruz, un lugar impactado con atrazina, y son capaces de crecer en sitios impactados debido a su adaptación y tolerancia a atrazina incluso a concentraciones mayores a 2500 ppm como se demostró con el análisis *probit*; es poco probable que este co-cultivo en ambientes extremófilos o con pH alcalino presente el mismo incremento en la actividad enzimática de *Trametes maxima*, además de que este basidiomiceto puede verse afectado por la interacción con otros microorganismos del medio, resultando en interacciones perjudiciales para *T. maxima* o para *P. carneus*, puesto que como se definió con el índice de antagonismo, un valor mayor o menor al indicado se traduce en la disminución de la respuesta enzimática o del crecimiento del hongo. Por lo anterior la biorremoción en suelo por enzimas producidas en co-cultivo es recomendable mediante la aplicación del liofilizado o extracto enzimático y no mediante el inóculo directo con hongos, de esta manera la biodegradación es más viable siempre y cuando las condiciones químicas del suelo permitan la estabilidad de las enzimas.

Para la remoción en agua no es muy recomendable utilizar la remoción con co-cultivos debido a que estos hongos aunque son capaces de formar pellets que facilitan la transferencia de masa y su recuperación, no están adaptados para crecer en agua, a menos que el medio sea enriquecido con fuentes de carbono, lo que no resulta ventajoso para la biorremediación de cuerpos de agua debido a que al enriquecer con nutrientes se altera el equilibrio carbono:nitrógeno, lo que a la larga podría conducir a procesos de eutrofización.

Por la problemática expuesta anteriormente la metodología que garantizaría el mantenimiento de la actividad enzimática sería la aplicación de liofilizados o extractos enzimáticos a sitios contaminados, de esta manera se mantiene la actividad enzimática que fuese obtenida mediante condiciones controladas.

La inducción enzimática fue posible mediante la formación de co-cultivos siempre y cuando las dos especies fueran compatibles entre sí, sin embargo aún no se ha podido esclarecer cuales son los factores que influyen en dicha compatibilidad puesto que existen varias teorías que explican la inducción enzimática en co-cultivos.

De entre las teorías más aceptables destacan A) la inducción por co-metabolismo, B) la inducción por radicales y C) la inducción por daños en pared celular. Para el caso de co-cultivos con levaduras la teoría más aceptada ha sido la inducción por co-metabolismo, ya que las levaduras fermentan metabolitos de otros hongos y estos productos fermentados por las levaduras inducen una respuesta enzimática en la otra especie [Li, 2010].

Las interacciones en co-cultivos que conllevan a un incremento de actividad parten del principio que señala que generalmente los genotipos somáticamente incompatibles resultan en el rechazo entre individuos [Hietala, 2003], esta diferencia entre genotipos se ve reflejada en la variedad de interacciones entre hongos, por ejemplo la interacción de “confrontación” ocurre debido a que cada especie detecta compuestos químicos no nativos los cuales inhiben el crecimiento [White, 1992], por lo que los hongos evitan el contacto para poder extender sus hifas hacia otra dirección sin entrar en contacto con los químicos inhibitorios. En cambio en la interacción “reemplazo” se induce autofagia que promueve el reciclaje de proteínas por lo que la energía de los basidiomicetos está más enfocada a reacciones de catabolismo y no de metabolismo [Faloner, 2008].

En el caso del co-cultivo de *T. maxima* con *P. carneus* se observó que la interacción entre estos dos hongos fue de inhibición a distancia, por lo que en este caso el aumento de actividad enzimática de *T. maxima* no se debió a la degradación de la membrana por autofagia ni a inducción de compuestos químicos no nativos que limitaran el crecimiento, además los cambios morfológicos inducidos por *P. carneus* no incluyeron daños en la pared celular por lo que para el caso de los co-cultivos de micromicetos con basidiomicetos se descartó que el mecanismo que indujo la actividad enzimática fuera el de daños en la pared celular, ya que de ser así, las vesículas presentes en el interior de las hifas estarían aglomeradas en el extremo apical, que es un cambio observado en caso de regeneración o crecimiento de la hifa. Este hecho se respaldó también en los resultados que se obtuvieron en el co-cultivo de *T. maxima* con *Aspergillus sp.* en el cual, la interacción fue de reemplazo, caso en el cual hay daño celular por autofagia y no hubo un incremento en la actividad enzimática de lacasa debido a que la energía obtenida del metabolismo estuvo dirigida al reciclaje de proteínas [Yorimitsu, 2005].

Debido a que los micromicetos con los que se formaron los co-cultivos no son levaduras también se puede descartar que el incremento de actividad de lacasa fuese por co-metabolismo. En cambio una inducción por radicales libres puede ser la teoría más acertada que explique el incremento en actividad enzimática, ya que en la respuesta morfológica al confrontamiento con el micromiceto *P. carneus* donde se observó un aumento de vesículas en *T. maxima*, las cuales no tienen una distribución apical, y se descarta que sean núcleos acumulados, pues a diferencia de los micromicetos los tabiques de los basidiomicetos, tienen poros complejos denominados doliporos, que no permiten el paso de los núcleos. Estas vesículas están distribuidas a lo largo de la hifa, lo que indica un intercambio entre el medio extracelular y las hifas, probablemente estas vesículas cumplan la función de captación de radicales libres para llevarlos al interior de la célula y hacer el entorno menos hostil para los hongos.

Los únicos hongos que fueron capaces de inducir la actividad enzimática de lacasa incluso en ausencia de atrazina, fueron *Trichoderma atroviride* y *Paecilomyces carneus*, mientras que *Aspergillus sp.* inhibió la actividad enzimática, esto nos indicó que el nivel de antagonismo adecuado para la inducción enzimática es de 2, es decir inhibición a distancia sin reemplazo, pues al inhibirse a distancia se indica que son cepas que en estado natural suelen competir y no conviven en un mismo entorno, por lo que están diseñados para responder competitivamente a la presencia del otro hongo mediante mecanismos de secreción de enzimas extracelulares. En co-cultivo se manifestaron algunos cambios en la actividad de lacasa, no sólo en cuanto al incremento en su actividad, sino que también se modificaron las condiciones bajo las cuales se favorece la expresión de enzimas extracelulares. En monocultivo las condiciones que mejoran la expresión enzimática son las condiciones ligninolíticas, con una mayor proporción de carbono aumenta la producción de lacasa, mientras que con una mayor proporción de nitrógeno se favorece el crecimiento y disminuye la producción de enzimas [Kannaiyan, 2012] [D'gostini, 2001] por lo que una disminución de fuentes de nitrógeno induce una producción de enzimas como lacasa LiP y MnP, sin embargo en co-cultivo estas condiciones no tuvieron el mismo efecto para las enzimas ligninolíticas.

Por el contrario tuvieron un efecto poco favorable con una disminución considerable de actividad enzimática en comparación con el monocultivo control. En monocultivo la concentración inicial de glucosa disminuye la actividad enzimática mientras que en co-cultivo incrementa la actividad enzimática, por ejemplo en el co-cultivo de *Ganoderma lucidum* y *Candida sp.* HSD07A la actividad enzimática incremento de <2000 U/L de lacasa a 10 000 U/L, al 7º día, sin embargo al estar en la condición de co-cultivo y añadir 10g/L glucosa estéril la actividad enzimática de glucosa decreció de nuevo, esta actividad enzimática no recuperó su nivel más alto de actividad aun y con la adición de *Candida sp.*, comportamiento que no se presentó en el monocultivo de *G. lucidum*, en donde la actividad enzimática de enzimas ligninolíticas recuperó sus niveles altos al disminuir la concentración de glucosa.

No sólo los co-cultivos indujeron la actividad enzimática de lacasa, la presencia de atrazina también demostró tener capacidad inductora, incluso se comprobó que existe una correlación entre el aumento de actividad enzimática de lacasa y la concentración de atrazina, pero como se demostró también en los resultados de remoción de atrazina, el que la lacasa sea liberada extracelularmente de manera proporcional a la concentración de atrazina no implica que se trate de una relación sustrato-enzima, sino que el aumento de enzimas extracelulares está implicada en el mecanismo de defensa no específico, puesto que otros basidiomicetos presentan el mismo incremento en actividad incluso aunque el sustrato no sea degradado por las enzimas involucradas [Galhaup, 2002] [Mougin 2002]. Esta actividad de lacasa pudo deberse a una reacción de co-metabolismo para intentar oxidar la atrazina, ya que se ha demostrado que algunos hongos que no producen lignina peroxidasa pero sí lacasa, producen un metabolito denominado 3-hidroxiantranilato, el cual media la oxidación de compuestos no fenólicos por la lacasa [Eggert, 1996].

La disminución en la concentración de atrazina en el extracto enzimático no fue debido a la degradación por lacasa, ya que el potencial de ionización más alto es de 7.80 eV, y la molécula de atrazina tiene sólo 4 sitios accesibles para la enzima, el primero es el ocupado por el ion Cl, que tiene un potencial redox de 13.01 eV, por lo que no es sustrato para la lacasa y la degradación por dechlorinación no es posible por enzimas extracelulares fúngicas, la única vía por la que las enzimas ligninolíticas y más específicamente la lacasa puedan degradar la atrazina es mediante N-dealquilación, con la remoción de metilos que tienen un potencial de ionización de 7.57 a 7.59, por lo que la N-dealquilación por lacasa es poco factible, pues para este proceso la lacasa tendría que tener un potencial de ionización 1.00 eV mayor al sustrato, como en el caso del benzo[a]pireno que es sustrato de lacasa y tiene un potencial de ionización menor a 7.45 eV.

Por lo anterior la remoción de atrazina en extracto enzimático probablemente se debió a procesos de unión a proteínas catalizada por la presencia de metales en el medio gastado. La unión de atrazina a proteínas ya ha sido demostrada, de hecho mediante la unión a proteínas es como la atrazina inhibe la fotosíntesis en plantas, uniéndose a la proteína Q_B, de 32kDa, en el fotosistema II, compitiendo con la plastoquinona.

Un aducto se forma por adición de moléculas formando un producto y se refiere a una entidad química que se produce por la unión de dos moléculas mediante un enlace covalente, y la atrazina es una molécula a la que recientemente se le atribuye esta capacidad. Se ha demostrado que la atrazina se une a proteínas mediante puentes de hidrógeno, necesita una distancia máxima de 2.5 Å y ángulos mínimos de 90° entre D-A-A-A (D=donador, A=aceptor y AA=aceptor antecedente) en proporciones considerablemente altas, por ejemplo para el caso de la albúmina humana la estequiometría de unión de atrazina /proteína es de 3:1 y 11:1 dependiendo de la concentración, a mayor concentración de atrazina el rango de unión fue mayor, para el caso de otros herbicidas fue de 45:1 y 10:1, lo que demuestra que este comportamiento no es exclusivo de la atrazina y que otros xenobióticos pueden tener esta capacidad de unión a proteínas [Purcell, 2001].

Otra de las proteínas con las que se ha demostrado que la atrazina es capaz de formar aductos es la fracción β de la globina (de ratas Sprague-Dawley) en especial en las fracciones que tienen aminoácidos cisteína, lisina, arginina, histidina y metionina, la atrazina puede ser capaz de formar aductos covalentes con macromoléculas [Dooley, 2006]. Al igual que la globina, la albúmina posee en sus sitios de unión aminoácidos como la lisina y cisteína (ANEXO IV), los cuales son aminoácidos a los que se puede unir la atrazina y formar un aducto; sin embargo los sitios activos de la lacasa carecen de lisina, arginina y son pobres en cisteína y metionina (ANEXO IV), por lo que es poco probable que la lacasa sea la responsable de la formación de aductos con atrazina, por lo que la adsorción de este herbicida pudo ser por otras proteínas extracelulares menores a 10 kDa, presentes en el medio gastado y por ello la remoción fue mayor en el medio no concentrado.

La isoterma de absorción demostró que la atrazina es capaz de unirse a estas proteínas en una proporción de 0.8:1, sin embargo aunque es posible que esta proporción sea mayor es poco probable que la proporción atrazina/proteína sea mayor 1:1, ya que la unión de atrazina no es cooperativa pues no se ajusta a un modelo de unión exponencial (ANEXO V) en el que cada molécula no es monovalente, debido a que la unión de ligando B a un sitio de A afecta la unión de otro B en otro sitio de A (Bohr, 1940).

12.- CONCLUSIONES

1. Los co-cultivos son capaces de inducir un incremento considerable en la actividad de lacasa (incremento de 9 veces en menos de 10 días).
2. La inducción enzimática en co-cultivo con *P. carneus* probablemente fue por radicales y compuestos químicos y queda descartada la inducción por daño celular.
3. En co-cultivo los resultados demostraron que el factor más importante para la producción de enzimas ligninolíticas como la lacasa fue proporción C:N y se requieren proporciones C:N altas (30) al inicio para el desarrollo de los 2 hongos.
4. La inducción de lacasa no es dependiente de la producción de peróxido de hidrógeno, incluso es un posible inhibidor de lacasa.
5. La lacasa no es capaz de degradar la atrazina debido a que su potencial redox es de 7.80 eV, mientras que el de los grupos alquilo de la atrazina tienen un potencial de ionización de 7.57 a 7.59.
6. La sorción de atrazina se debió a la formación de aductos con proteínas de peso molecular menor a 10 kDa y es un proceso de unión no cooperativa.
7. Es poco probable que la atrazina forme aductos con la lacasa, debido a que la lacasa carece de aminoácidos que suelen interactuar con la lacasa como la cisteína, lisina, arginina, histidina o metionina.
8. Aunque la respuesta de actividad enzimática de lacasa presentó una correlación con la concentración de atrazina esta respuesta no se relaciona con la afinidad de la lacasa por la atrazina como sustrato, sino que se debe a una respuesta inespecífica a xenobióticos en el medio.

13.- RECOMENDACIONES A FUTURO

- Algunas cepas de *Paecilomyces sp.* pueden ser capaces de inducir una respuesta enzimática mayor en *T. maxima* y presentando la ventaja de que no ser patógenas como es el caso de *P. formosus*
- La actividad enzimática de lacasa puede usarse para degradar catalíticamente otros compuestos con μl menores a 7 eV., como en el caso de los polifenoles tal como benzo[a]pireno.
- La inducción de lacasa por co-cultivos puede aprovecharse para otros fines, tales como la formación de polímeros (Ullah, 2000).
- Existe una alta probabilidad de que la degradación de atrazina sea un proceso intracelular mediado por el citocromo p-450, por lo que es recomendable investigar esta degradación dentro del micelio.

14.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams CD, Thurman EM, Formation and transport of deethylatrazine in the soil and vadose zone, *J Environ Qual*, 20 (1991), pp. 540–547
- 2) ANEAS , Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento (PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-XXXX). Asociación Nacional de Empresas de Agua y Saneamiento, 2007. [en línea]. <http://www.aneas.com.mx/contenido/nom.pdf>, última consulta 26 febrero 2014.
- 3) Anson M., 1938, The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79-89.
- 4) Asakura T., Watanabe H., Ab K., Arai S., 1997, Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application ton milk clotting. *J. Agric. FoodChem.* 45:1070-1075.
- 5) (ATSDR) U.S. Centers for Disease Control Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2003. "Toxicological Profile for Atrazine." [en línea] <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153.html>. Último acceso 1 Marzo, 2014.
- 6) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease registry), Toxicological Profile for Atrazine , Department of health and human services , U.S., September 2003.
- 7) Barr David P., Shan Manish M , Chung Namhyun , Aust Steven D. Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals Original Research Article *Toxicology Letters, Volumes 64–65, December 1992, Pages 493-501* Manish.
- 8) Bohr C. Die Sauertoff auf nahme des genuinen blutfarbttoffes und des aus dem Blute dargestellen Hämoglobins *Zentralblatt Physiol* 23 688-690.1940
- 9) Bourbonais, R., Paice, M., Reid, I.D. Lantheir, P. Yagudhi, Lignin Oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes Versicolor* and role of the mediator 2,20 azinobis (3-3 ethylbenzrhi-asoline-6-dulfonate) in kraft lignin depolymerisation. *Applied environmental Microbiology* 61, 1876-1880, 1995.
- 10) Bradford M., A rapid sensitive? method for for the cuantitation of microrm cuantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* , vol. 7, no. 72, p. 248-254, 1976.
- 11) Cameron, M.D., S. Timofeevski y S.D. Aust. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6): 751-758. , 2000.
- 12) Chi Yujie, Hatakka Annele , Maijala Pekka, Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? , *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 59, Issue 1, Enero, 2007, Pages 32–39 ,<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.025>.
- 13) Chirnside Anastasia E.M., Ritter William F., Radosevich Mark, Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor, *Soil Biology and Biochemistry* Volume 39, Issue 12, December 2007, Pages 3056–3065; <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.018>.
- 14) Christian V., R. Shrivastava, D. Shukla, H.A. Modi y B.R. Vyas.. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology* 43(4): 301-312, 20052005.
- 15) Correia F.V., Macrae A., Guilherme L.R.G. y Langenbach T. Atrazine sorption and fate in a Ultisol from humid tropical Brazil. *Chemosphere* 67, 847-854., 2007.
- 16) Cummings AM, Rhodes BE, Cooper RL. , Effect of atrazine on the implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. *Toxicol Sci* 58:135-143., 2000.
- 17) Christian M, Claude J, Pierre B, Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environ Chem Lett* 1:145–148, 2003.

- 18) D'Agostini EC, Mantovani TRD, Valle JS, Paccola-Meireles LD, Colauto NB, Linde GA. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Sci. Agric.* 68: 295-300, 2011
- 19) Da-Cunha Jonathan, Bellini Inés M., Pinelli Laura, Fernandez-Scavino Ana, Davyt Danillo, Determination of atrazine and intermediates of biodegradation in a liquid culture medium for the enrichment of the microbial consortia., 7th congress of environmental UNLP, May, 2012.
- 20) Delgado-Jarana, J., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T.: Overproduction of β -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochim Biophys Acta* 1481, 289–296, 2000.
- 21) Dooley Greg P., Prenni Jessica E., Prentiss Pilar L., Cranmer Brian K., Andersen Melvin E. y Tessari John D. Identification of a Novel Hemoglobin Adduct in Sprague Dawley, *Chem. Res. Toxicol.* 19, 692-700, 2006.
- 22) Eggert Claudia, Temp Ulrike, Dean Jeffrey F.D., Eriksson Karl-Erik L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase August 5, Volume 391, Issues 1-2, Pages 144–148. 1996.
- 23) Evans Christine S. y Hedger John N., Degradation of plant cell wall polymers, G.M. Gadd, Ed., British Mycological Society Symposium Series 23, pp. 13-20, Cambridge Uni. Press, UK, 2001.
- 24) Falconer Ruth E., Bown James L., White Nia A. y Crawford John W., Modelling interactions in fungi, *J. R. Soc. Interface* 5, 603–615, 2008.
- 25) Felsot Allan, Environmental Toxicologist at the Food and Environmental Quality Laboratory, Washington State University., *Agrichemical and Environmental News*, 132, February 1997.
- 26) Fruhstorfer P., Schneider R.J., Weil L., Niessner R. Factors influencing the adsorption of atrazine on montmorillonitic and kaolinitic clays, *Sci. Total Environ.*, 138 pp. 317–328, 1993.
- 27) Gianfreda, L., F. Xu, and J. M. Bollag. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.* **3**.1999
- 28) Gilchrist Glen F. R., Gamble Donald S., Kodama Hideomi, Khan Shahamat U. Atrazine Interactions with Clay Minerals: Kinetics and Equilibria of Sorption+ Centre for Land and Biological Resources Research, Central Experimental Farm, Agriculture Canada, Ottawa, Ontario K1A 0C6, Canada 1993.
- 29) Guillén-Garcés R.A., Hansen A.M. y Afferden van M., Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 844-850.2007.
- 30) Guillén Francisco, Muñoz Carmen, Gómez-Toribio Víctor, Martínez Angel T. and Martínez María Jesús, Oxygen Activation during Oxidation of Methoxyhydroquinones by Laccase from *Pleurotus eryngii*, *Environ Microbiol.*; 66(1): 170–175, 2000.
- 31) González-Márquez L.C. y Hansen A.M., Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelo del DR 063 Guasave, Sinaloa. *Rev. Mex. Cienc. Geol.* 26, 587-599. 2009
- 32) Gorge Julio López, Fijación y movilización biológica de nutrientes Vol I, Consejo Superior De Investigaciones Científicas, España p: 130 132, pp. 247, 1999.
- 33) Govantes Fernando, Porrúa Odil, García-González Vicente, Santero Eduardo, Atrazine biodegradation in the lab and in the field: enzymatic activities and gene regulation, *Microbiology Biotechnology*, 2009.
- 34) Hammel KE, Kalyanaraman B, Kirk TK, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J Biol Chem*, 261:16948–16952, 1986
- 35) Hammel K, Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. In: Young LY, Cerniglia CE(eds) *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss, New York, pp 331–346, 1995.
- 36) Hernández-Antonio A. y Hansen A. M., Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev. Internacional de Contaminación Ambiental*, 27, 115-127. 2011.
- 37) Herwig Ulrich, Klumpp Erwin, Narres Hans-Dieter, Schwuger Milan J. Physicochemical interactions between atrazine and clay minerals, Institute of Applied Physical Chemistry, Research Centre Jülich, D-52425 Jülich, Germany, *Applied Clay Science*, Volume 18, Issues 5–6, Pages 211–222, 2001.
- 38) Hietala, A., Korhonen, K. & Sen, R. An unknown mechanism promotes somatic incompatibility in *Ceratobasidium bicorne*. *Mycologia* 95, 239–250.2003
- 39) Hofrichter, M. ,Review: lignin conversion by manganese peroxidase MnP. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 454-466.,2002.

- 40) Howell C.R., Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87, 4–10, 2003.
- 41) Ichinose, H., H. Wariishi and H. Tanaka. 2002b. Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(6): 658-664.
- 42) Ichinose, H., H. Wariishi and H. Tanaka H. Identification and characterization of novel cytochrome P450 genes from the white-rot basidiomycete, *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(1): 97-105. 2002
- 43) Jensen H.L. and Abdel-Ghaffar A.S. Cyanuric acid as nitrogen source for microorganisms. *Arch. Microbiol.* 67, 1-5. 1969.
- 44) Kannaiyan Ranjani, Mahinpey Nader, Mani Thilakavathi, Martinuzzi Robert J., Kostenko Victoria. Enhancement of *Dichomitus squalens* tolerance to copper and copper-associated laccase activity by carbon and nitrogen sources, *Biochemical Engineering Journal* 67, 140–147, 2012.
- 1) Kapat A., Elad, Y., The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:177-189.1999
- 2) Karickhoff, S. W.; Morris, K. R. Sorption Dynamics Of Hydrophobic Pollutants In Sediment Suspension. *Environ. Toxicol. Chem.* 1985, 4, 469-479.
- 3) Katagi Toshiyuki, Behavior of pesticides in Water-Sediments Systems, *Rev. Environ Contam Toxicol* 187:133-251, Springer 2006.
- 4) Kaufman. D.D., Kearney. P.C. and Sheets, T.J. Microbial degradation of simazine. *J. Agric. Food Chem*, 13~ 238-242. 1965.
- 5) Kearney, P.C., Kaufman, D.D. and Sheets, T.J. Metabolites of simazine by *Aspergillus fumigatus*, *J. Agric,Food Chem.* 13, 369-372. 1965.
- 6) Keyser P., Kirk T.K. and Zeikus J.G., Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium*: synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation, *J. Bacteriol.*, 135(3):790. 1978
- 7) Kiassen Norman, Marchington David y McGowant Hatcher, H₂O₂ Determination by the Is- Method and by KMnO₄ Titration, *Institute for National Measurement Standards, Ionizing Radiation Standards, National Research Council , Canada, Ottawa K1A 0R6 Canada, Anal. Chem.* 1994,66, 2921-2925. 1994
- 8) Kirk T. Kent Connors W. J. y Zeikus J. Gregory Requirement for a Growth Substrate During Lignin Decomposition by Two Wood-Rotting Fungi *Appl Environ Microbiol.*; 32(1): 192–194. 1976.
- 9) Kredics L., Antal Zsuzsanna, Szekeres A., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi C., Nagy Elisabeth., Extracellular proteases of trichoderma species - a review, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2005.
- 10) Li Jinhe, Langford Cooper H., Gamble Donald S. Atrazine Sorption by a Mineral Soil: Processes of Labile and Nonlabile Uptake, Department of Chemistry and Biochemistry, Concordia University, 1455 de Maisonneuve Boulevard West, Montreal, Quebec H3G 1M8, Canada , 1996.
- 11) Li Ping, Wanga Hailei, Liu Guosheng, Li Xin, Yao Jianming, The effect of carbon source succession on laccase activity in the co-culture process of *Ganoderma lucidum* and a yeast, *Enzyme and Microbial Technology* 48,1–6, 2011.
- 12) Marcacci S¹, Raventon M, Ravanel P, Schwitzguébel JP. The possible role of hydroxylation in the detoxification of atrazine in mature vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics, *Z Naturforsch C*. May-Jun;60(5-6):427-34, 2005.
- 13) Macalady, D. L.; Wolfe, N. L. Abiotic Hydrolysis Of Sorbed Pesticides. *ACS Symp. Ser.* 1984, 259, 221-244.
- 14) Maloney Sarah E., Degradation of Insecticides and Herbicides by Fungi, G.M. Gadd , Ed., British Mycological Society Symposium Series 23, pp. 188-223 Cambridge Uni. Press, UK, 2001.
- 15) Markee Tom & Prihoda Kelsey , **STANDARD OPERATING PROCEDURE Procedure for Analyzing Hydrogen Peroxide Concentrations in Water** Procedure No: GSI/SOP/BS/RA/C/7 Issue Date: June 15, 2009
- 16) Mikolasch Annett and Schauer Frieder, **Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009.
- 17) Montoya J., Costa J., Liedt R., Bedmar F. y Daniel P., Effects of soil and tillage practice on atrazine transport through intact soil cores. *Geoderma* 137, 161-173. , 2006.

- 18) North M., Comparative Biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms, *Microbiol. Rev.*, 46:308-340. 1982.
- 19) Ollikka Pauli, Alhonmäki Kirsi, Leppänen Veli-Matti , Glumoff Tuomo , Rajola Timo y Suominen Ilari, Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 59 no. 124010-4016 December 1993.
- 20) Olga L; Urrego F.A. (2000), Producción de celulasas a Partir de hongo *Trichoderma* sp. y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano., 2000
- 21) On-Anong Phewnil, Nipon Tungkananurak , Supamard Panichsakpatana, Bongotrat, Pitiyont , Namyen Siripat y Hirozumi Watanabe, *The Residues of Atrazine Herbicide in Stream Water and Stream Sediment in Huay Kapo Watershed, Phetchabun Province, Thailand*, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan, 2008, Research Article: 42-52.
- 22) Parris, G. E. Covalent Binding Of Aromatic Amines To Humates. 1. Reactions With Carbonyls And Quinones. *Environ. Sci. Technol.* 1980, 14, 1099-1106.
- 23) Purcell M, Neault J.F., Malonga H., Arakawa H., Carpentier R., Tajmir-Riahi H.A. Interactions of atrazine and 2,4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis, and FTIR spectroscopy *Biochimica et Biophysica Acta* 1548,129^138. 2001.
- 24) Quintero -Díaz Juan Carlos, **Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera**, *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 64(1)5867-5882. 2011.Ramos Cabral Coelho; Heverton Vazzoler; Waldileira Pereira Leal, Empleo do carvão ativado para remoção de atrazina em água de abastecimento público, *Edumar Eng. Sanit. Ambient.* vol.17 no.4 Rio de Janeiro Oct./Dec. 2012.
- 25) Reátegui, Eduardo ; Reynolds, Erik; Kasinkas, Lisa; Aggarwal, Amit; Sadowsky, Michael; Aksan, Alptekin; **Wackett**, Lawrence, *Applied Microbiology & Biotechnology.* Oct 2012, Vol. 96 Issue 1, p231-240. 10p.
- 26) Rodakiewicz-Nowak, J. 2000. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis* 11:419-434.
- 27) Rodriguez-Kabana, R., Kelley, W.D., Curl, E.A.: Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed cultures with *Sclerotium rolfsii* in soil. *Can J Microbiol* 24, 487–490, 1978.
- 28) Rodriguez-Kabana, R., Enzymatic interactions of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in mixed soil culture. *Phytopathology* 59, 910–921 1969.
- 29) Rogalski J., Leonowicz, *Concise Encyclopedia of bioresource Technology*, Food products Press, Haworth reference Press, pp. 533-542 , 2004.
- 30) SAGARPA, Anteproyecto de Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-032-FITO-1995. Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas agrícolas y su dictamen técnico. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007. [en línea]. [http://www.cofemermir.gob.mx/mir/uploadtests/10046.59.59.1.NOM-%20032-FITO-1995%20\(MODIF\).doc](http://www.cofemermir.gob.mx/mir/uploadtests/10046.59.59.1.NOM-%20032-FITO-1995%20(MODIF).doc). (Último acceso 20 Febrero del 2014).
- 31) Sariaslani, F.S. 1991. Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism. *Advances in Applied Microbiology* 36: 133-178.
- 32) Shleev S.V. , Morozova O.V. , Nikitina O.V. O.V. , Gorshina E.S. , Rusinova T.V. , Serezhenkov V.A. , Burbaev D.S. D.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I., Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes *Biochimie* 86 693–703. 2004.
- 33) Shindo Kazutoshi,Suzuki Hidefumi, Okuda Toru, Paecilopeptin, a new cathepsin S inhibitor produced by *Paecilomyces carneus*, *Japan Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (11), 2444–2448, 2002
- 34) Šimić B, Kniewald J, Kniewald Z.. Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. *J., Appl Toxicol* 14(6):401-404. , 1994.
- 35) Summersgill, I.M. and D.W. Scott.,Remediation technology costs in the UK and Europe. Report. VHE Technology. Barnsley, UK. 8 p. 2005.
- 36) Sunil SM, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malani Am Veena SM. 2011. Isolation, purification and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research.* Volume 2011, Article ID 248735, 7 pages, doi:10.4061/2011/248735. 2011

- 37) Tórtora, Berdell R. Funke, Christine L. Case (2007), *Introducción a la microbiología*, Gerard 9a edición, PANAMEICANA, México, pp 931, p 346., 2007
- 38) USEPA , *Decisión Documents for Atrazine*. Office of prevention, Pesticides and Toxic Substances. United States Environmental Protection Agency, 2006. [en línea] http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/atrazine_combined_docs.pdf. (Último acceso febrero 28, 2014).
- 39) Uchikoba, T., Mase, T., Arima, K., Yonezawa, H., Kaneda, M.: Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol Chem* 382, 1509–1513, 2001.
- 40) Ullah M. A, Bedford C. T., Evans C. S. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 230±234. 2000
- 41) Villada-Canela M., *Estimación del riesgo de contaminar mantos freáticos por infiltración de herbicida atrazina en distritos de riego en México*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, México, 2006.
- 42) Vermuelen N. M. J., Apostolides Z. and Potgieter D. J. J., Separation of atrazine and some of its degradation products by high performance liquid chromatography, Department of Biochemistry, *Journal of Chromatography*, 240 (1982) 247-253, University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa, 1982)
- 43) Ware G., *The pesticides book*. 5a ed., Thomson Publications. Fresno, California, EUA, pp.123-145., 2000.
- 44) Wong, Dominic W. S., *Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes*, Applied biochemistry and biotechnology ABAB, May, v. 157, no. 2, 2009.
- 45) White, N. & Boddy, L. Extracellular enzyme location during interspecific fungal interactions. *FEMS Microb. Ecol.* 98, 75–80. 1992
- 46) Wilberth Chan Cupul, Gabriela Heredia Abarca, Refugio Rodríguez Vázquez **Interspecific Interactions and Extracellular Selected Enzyme Activities in White-rot Basidiomycetes and Soil Borne Micromycetes Mixed Cultures**, ^a Instituto de Ecología , CINVESTAV-IPN, México. ____ año
- 47) Yamaguchi T., Yashita Y., Takeda I., Kiso H. (1983). Proteolytic enzymes in green asparagus kiwi fruit and muit, occurrence a partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* 46:1983-1986.
- 48) Yorimitsu, Y. & Klionsky, D. J. Autophagy: molecular machinery for self eating. *Cell Death Differ.* 12, 1542–1552. 2005
- 49) Yun-Yang Wana, Ling Xiaoc, Yu-Min Duc, Tetsuo Miyakoshib, Chen-Loung Chend, *Effects of Organic Solvents on the activity of Rhus laccases*, China, 2012
- 50) **Zhang Percival, Hong Jiong, y Ye Xinhao** , Jonathan R. Mielenz (ed.), *Biofuels: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 581 , Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, 2009 DOI 10.1007/978-1-60761-214-8_14.
- 51) **Zúñiga-silva y col. Role of the symbiotic fungi associated to the rizosphere of Phragmites australis in phosphate solubilization on presence of metals. Tesis de doctorado en proceso. Cinvestav. 2015**

RESUMEN IN-EXTENSO PARA III SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Trametes maxima* EN CO-CULTIVO CON MICROMICETOS DE SUELO EN AGUA SINTÉTICA-AGAR (ASA) CON ATRAZINA COMO FUENTE DE "C" Y "N"

María Fernanda Romo-García, Dra. Refugio Rodríguez-Vázquez¹, Wilberth Chan-Cupul²,

Dr. Luis G. Torres-Bustillos³, Dra. Ma. Del Carmen Montes-Horcasitas¹.

¹CINVESTAV-IPN, Av. IPN No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México,

D.F. ²INECOL A.C., antigua carretera a Coatepec No. 351, C.P. 91070, Xalapa, Veracruz,

México. ³UPIBI-IPN, Acueducto de Guadalupe s/n, La Laguna Ticoman, Gustavo A.

Madero, 07340 Ciudad de México, D.F. E-mail: mromog@cinvestav.mx

Palabras clave: Enzimas ligninolíticas, interacciones, micorremediación, biotecnología verde

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 co-cultivo así como caracterizar la influencia que tiene esta condición sobre el crecimiento y la producción de enzimas.

Introducción: En la agricultura convencional, la atrazina es el herbicida más empleado en todo el mundo y en México es el tercer herbicida más usado [1]. Este herbicida es considerado como un disruptor endocrino, al ocasionar anomalías en el desarrollo reproductivo e inmunosupresión en organismos no blancos (anfibios, reptiles, peces y mamíferos) [2], 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 decontaminación de agua y suelo [3]. La micorremediación consiste en la aplicación de hongos o sus enzimas para la remoción, degradación o transformación del contaminante [4]. Este proceso es mediado por enzimas extracelulares como las lacasas (EC 1.10.3.2) y manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.14) [4]. 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 co-cultivo de basidiomicetos con micromicetos de suelo, es ventajoso para la producción de lacasa y MnP, comparado al simple monocultivo de basidiomicetos [5]. Sin embargo, en cuanto a la remoción de atrazina en agua contaminada a través de co-cultivos fúngicos, aún está en fase de investigación. Por lo tanto, para conocer la habilidad de los co-cultivos para

adaptarse a agua contaminada, el objetivo de este trabajo fue: 1) evaluar la compatibilidad de *Trametes maxima* con hongos micromicetos de suelo a través de co-cultivos en agua sintética-agar (ASA), 2) evaluar la actividad lacasa y MnP en los co-cultivos 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 y col. [5] y Heredia y Arias [6], respectivamente, el resto de los micromicetos de suelo, fueron aislados de suelo rizosférico de *Phragmites australis* colectado en La Macha, Actopan, Veracruz. Los co-cultivos se realizaron en cajas Petri con ASA (Glucosa 40 µg/l, KH₂PO₄ 28µ/L, NH₄NO₃ 30µ/l), el cual se elaboró en base a 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 co-cultivos 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 filamentoso del lado derecho (5 µl de una solución de 1 × 10⁷ 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 a la escala establecida por Badalyan y col. [7], 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 [8].

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 reemplazo parcial sobre *T. maxima* (Tabla 1). Por lo tanto, estas cepas no son compatibles con *T. maxima* (Figura 1).

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

MICROMICETOS DE SUELO Y SU INTERACCIÓN CON T. MAXIMA					
	TRIC	PEN1	PEN2	AS	PAE

Clave de interacción	B	B	A	C _{A1}	B
Valor de interacción	2	2	1	3.5	2

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

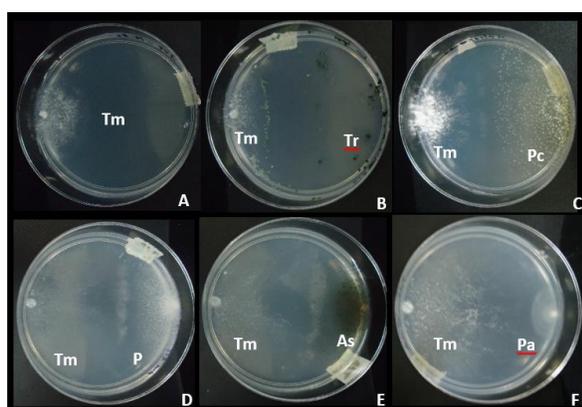


Figura 1. Tipos de interacción entre *Trametes maxima* y hongos de suelo en agua sintética agar (ASA).

En cuanto a la actividad enzimática en ASA, se encontró una mayor actividad de MnP en el co-cultivo de *T. maxima*-*Penicillium* sp. No. 1 (8 U/L, Figura 2A), comparado con el monocultivo de *T. maxima*. Sin embargo, cuando a este co-cultivo 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 co-cultivo 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) [9]. Sin embargo, 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 [10].

Respecto a la actividad lacasa, *T. maxima* no incrementa la actividad de la enzima cuando se dispuso en co-cultivo en medio de ASA sin atrazina. Por el contrario, cuando se le adicionó atrazina al ASA y se dispuso a *T. maxima* en co-cultivo con *Penicillium* sp. No. 1 y *Trichoderma* sp., se encontraron un incremento 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 Mougin y col. [12], quienes encontraron un incremento en la actividad lacasa entre 3.6 y 4.0 veces al crecer a *T. versicolor* en medio de cultivo con atrazina (5 mM).

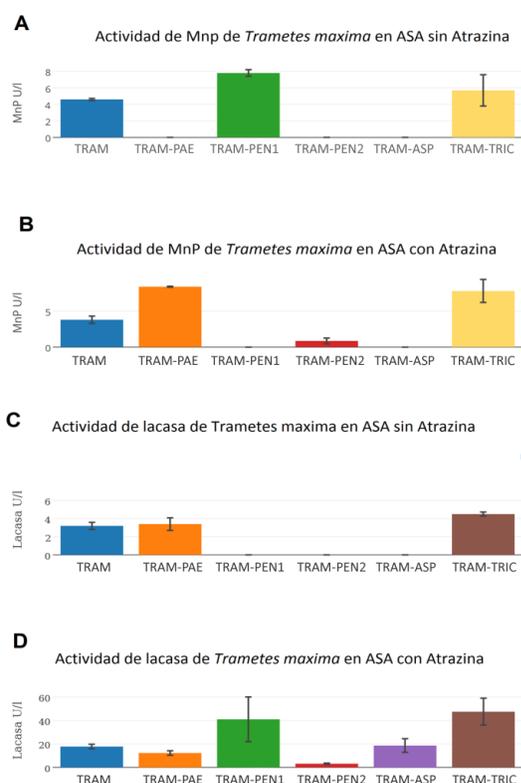


Figura 2. Actividad MnP y lacasa en el co-cultivo de *T. maxima* y micromicetos de suelo en ASA con y sin atrazina.

Por lo visto, 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 [9, 11, 12].

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 [11]. Los aportes de este

trabajo son puntuales respecto a la selección de co-cultivos con actividad lacasa y MnP bajo estrés por atrazina en ASA. Tomando en consideración lo mencionado, el co-cultivo entre *T. maxima* y *Trichoderma* sp., es candidata a emplear en el estudios de micorremediación de atrazina en agua contaminada, debido a que se vio un incremento en la actividad lacasa y MnP.

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

Agradecimientos: Especialmente Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez y Wilberth Chan Cupul.

Bibliografía.

- Hernández-Antonio A & Hansen AM, (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev. Internacional de Contaminación Ambiental*, 27, 115-127.
- (ATSDR) U.S. Centers for Disease Control Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2003) "Toxicological Profile for Atrazine." (2003) [en línea]

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153.html>.

Último acceso 1 Marzo, 2014.

3. Barr David P., Shan Manish M , Chung Namhyun , Aust Steven D. (1992), Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals Original Research Article *Toxicology Letters, Volumes 64–65, Pages 493-501*

4. Christian V., R. Shrivastava, D. Shukla, H.A. Modi y B.R. Vyas (2005), Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology* 43(4): 301-312, 2005.

5. Chan-Cupul Wilberth, Gabriela Heredia-Abarca, Dra. Refugio Rodríguez- Vázquez (2014), Interspecific Interactions and Extracellular Selected Enzyme Activities in White-rot Basidiomycetes and Soil Borne Micromycetes Mixed Cultures, D.F., México.

6. Heredia AG, Arias MR. (2008) Saprobies and endomycorrhizal fungi in soils. In: Manson RH, Hernández VO, Gallina S, Mehlreter K, editors. Coffee agroecosystems of Veracruz: Biodiversity, conservation and management. Veracruz, México: (INECOL A. C.) and (INE-SEMARNAT);. p. 193–213.

7. Badalyan S.M.,Innocenti Gloria, Narine Grigory. (2004) Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 44–48.

8. Qian Linbo, Chen Baoliang,(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.

9. 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*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 64, 156-161.

10.Gorbatova O. N., Koroleva O.V., Landesman E. O., Stepanova EV, Zherdev A.V. (2006), Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis *Prikl Biokhim Mikrobiol.* Jul-Aug;42(4):468-74.

11. 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). *J. Basic Microbiol.* 45(6), 460-469.

12. Mougín C, Kollmann A, Jolivalt C. (2002) Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol Lett.* 24, 139-142.

ANEXOS

I.- METODOLOGÍAS

Determinación de producción de peróxido.

A altas concentraciones de KI, el equilibrio entre I_2 , I^- e I_3^- el equilibrio está desplazado favorablemente hacia la producción de I_3^- . La medición de I_3^- por su absorbancia óptica es la base del método. El alto valor del coeficiente de extinción molar $\epsilon_{\max}(I_3^-)$ hace a este método de cuantificación más efectivo ya que se pueden medir cambios en la concentración de H_2O_2 de 10^{-9} M. La reacción entre H_2O_2 e I^- es lenta pero se cataliza por la adición de molibdato de amonio. [Klassen 1994].

Se preparan tubos con 3 mL de muestra o solución estándar (H_2O_2) según sea el caso. Si el volumen de la muestra no es suficiente se procede a tomar alícuotas de 10% del volumen de la muestra. Posteriormente se agregan 3 mL de reactivo A, 3 mL de reactivo B y 30 mL de H_2O , si se estima que la muestra tiene una concentración de H_2O_2 Mayor a 3. mg/ml la muestra deberá ser diluida.

Los tubos que contiene la muestra/estándar con los reactivos A y B se agitan vigorosamente durante un periodo de tiempo mínimo de 5 min. terminado el tiempo de incubación se procede a leer la absorbancia de las muestra a $\lambda 531$ nm [Markee, 2009].

Actividad de Lacasa

La actividad de lacasa se mide por la oxidación de ABTS. Se adicionan 100 μ l de ABTS 5 mM, 800 μ l 800 μ l de Buffer de acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5,) y 100 μ l de extracto de enzima. La oxidación de ABTS se monitorea determinando un incremento en la absorbancia a 420 nm [Sunil, 2011]. La actividad de MnP (U/mL) se determinó de acuerdo a la fórmula:

$$ULacasa = \left(\frac{Abs \times Vt}{t \times \epsilon \times \lambda \times Vm} \right) 1000000$$

Donde:

Abs= absorbancia

Vt= volumen total de reacción

Vm= volumen de muestra

λ = longitud de celda

t= tiempo de reacción

ϵ = coeficiente de extinción molar $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Actividad de Manganese peroxidasa

La actividad de MnP se mide por la oxidación de rojo fenol. El medio de reacción contiene 50 µl de rojo fenol al 0.2%, 50 µl de lactato de sodio 25mM, 50 µl de MnSO₄ 2 mM , 50 µl de albúmina de huevo al 0.1% , 50 µl de buffer succinato de sodio 50 mM pH 4.5 (), y 0.7 ml de muestra.

La reacción comienza con la adición de 50 µL de H₂O₂ 2 mM, la reacción es detenida con la adición de 50 µL de NaOH 2N, la reacción debe detenerse a los 5 minutos. Se mide la absorbancia a 610 nm, el coeficiente de extinción molar del fenol oxidado es 22 mM⁻¹cm⁻¹. La actividad de MnP (U/mL) se determinó de acuerdo a la fórmula:

$$UMnP = \left(\frac{Abs \times Vt}{t \times \epsilon \times \lambda \times Vm} \right) 1000000$$

Donde:

Abs= absorbancia

Vt= volumen total de reacción

Vm= volumen de muestra

λ= longitud de celda

t= tiempo de reacción

ε= coeficiente de extinción molar 4, 460 M⁻¹ cm⁻¹

Actividad de proteasas ácidas

La actividad de las proteasas ácidas se cuantificó midiendo la degradación de hemoglobina. Esta solución se prepara disolviendo 2% (p/v) de hemoglobina en buffer acetatos 25 mM a pH 3.5 a 60° por 20 minutos. El medio de reacción contiene 1 mL de hemoglobina al que se le adicionan 0.25 mL de extracto enzimático. La reacción se incuba a 37°C durante 20 min y posteriormente se detiene con 0.25 mL de ácido tricloroacético al 10% (p/v), posteriormente la mezcla se incuba a 4°C durante 15 min y se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 min, se toma una alícuota del sobrenadante y la actividad se mide a 280 nm. La actividad de proteasas (U/mL) se determinó de acuerdo a la fórmula establecida por Yamaguchi (1983):

$$Um/ml = \left(\frac{Abs \times dil}{0.001 \times t \times V} \right)$$

Abs = Absorbancia medida a 280nm

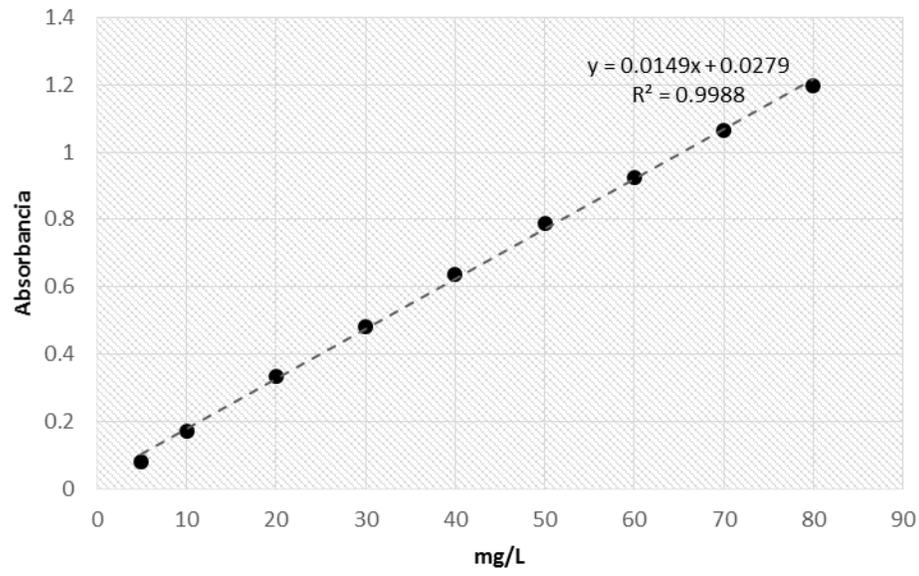
dil = dilución

t = tiempo en min

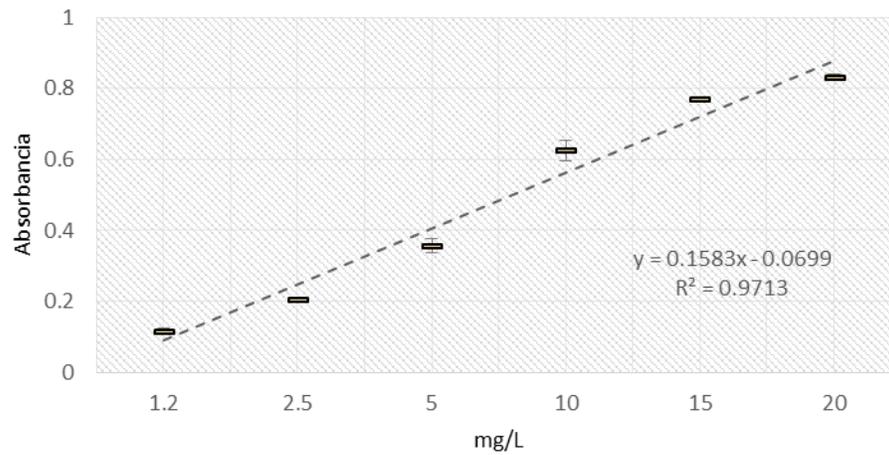
V = volumen del extracto enzimático (mL)

II.- CURVAS DE CALIBRACIÓN

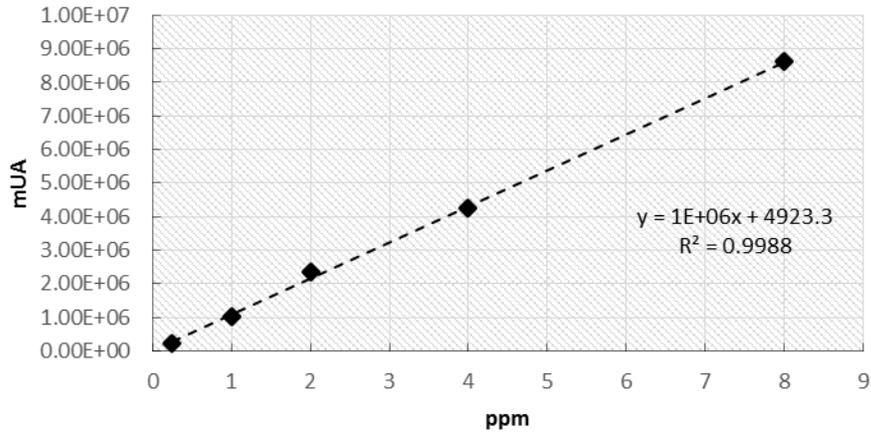
Curva de calibración de peróxido



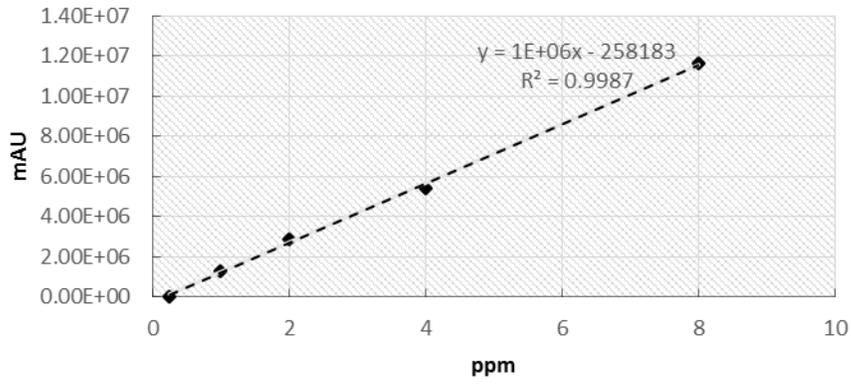
Proteína por método Bradford



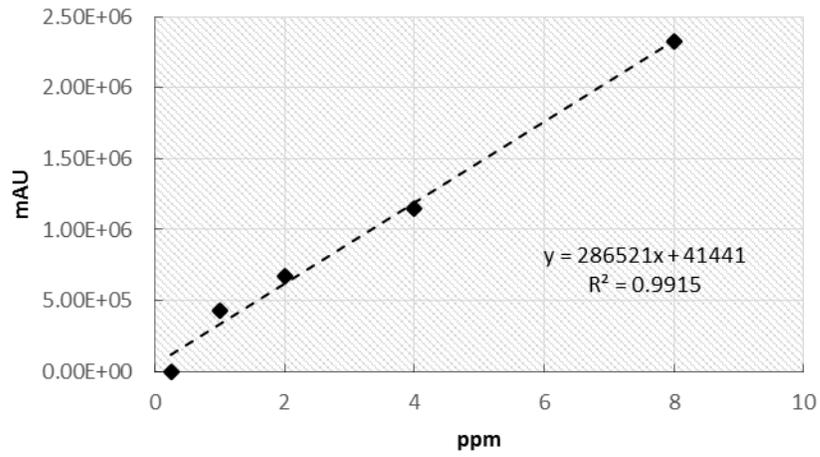
Atrazina



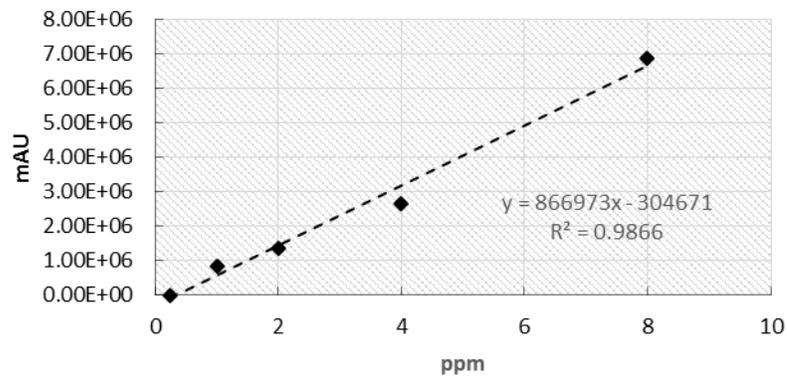
Deisopropilatrazina



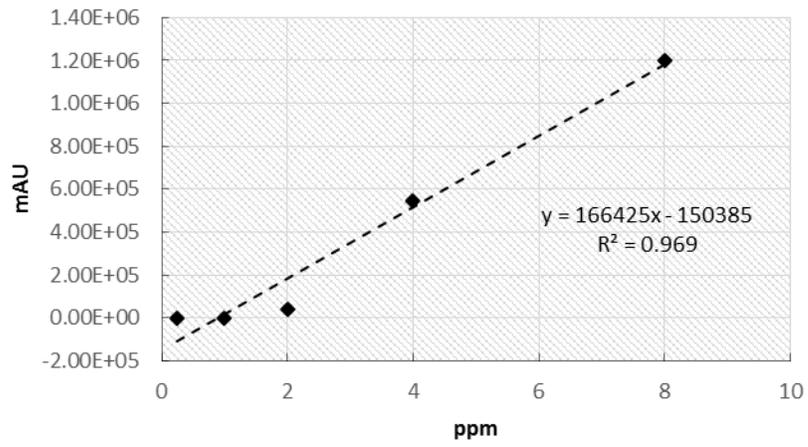
Ácido Cianúrico



Desetilatrizina



Hidroxiatrazina



III.- TABLA DE RESULTADOS DE DCC

Diseño compuesto central para monocultivo de <i>Trametes maxima</i> *A= Glucosa, *B= Sulfato de amonio.							
Tiempo (Hr.)	p<0.05	R ²	Respuesta máxima			interacción	Gráfica superficie respuesta
			A	B	U/mg Lacasa		
72	BB	87.763	-1	+1	12	No	
96	AA	86.755	-1	-1	16	sí	
210	A, B	93.104	+1	+1	19.1	no	
144		83.5074	+1	-1	32	sí	
168	BB	83.710	-1	-1	13	sí	
240	A, BB	92.397	-1	-1	8.9	no	
264	--	73.572	-1	-1	6.6	sí	

Diseño compuesto central para co-cultivo de *Trametes maxima* y *Pecilomyces carneus*

*A= Glucosa, *B= Sulfato de amonio.

Tiempo (h)	p<0.05	R2	Respuesta máxima			interacción	Gráfica superficie respuesta
			A	B	U/mg Lacasa		
72	--	81.0063	-1	+1	12	No	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>
96	AA	86.984	0	0	53	Sí	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>
120 24 h después de inóculo con micromiceto	A, AB	67.213	+1	+1	240	sí	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>
144	B, AA, AB, BB	73.970	+1	-1	450	sí	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>
168	B, AA, AB, BB	95.25	+1	+1	135	sí	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>
192	A	86.075	-1	+1	318	sí	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>
240	BB	77.70	-1	+1	610	NO	<p>Superficie de Respuesta estimada</p>

IV.- SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS EN SITIOS DE UNIÓN

Albúmina (Homo sapiens)

```
>gb|AAA98797.1|:51-127 albumin [Homo sapiens]
FAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEP
ERNECF
>gb|AAA98797.1|:159-185 albumin [Homo sapiens]
LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRY
```

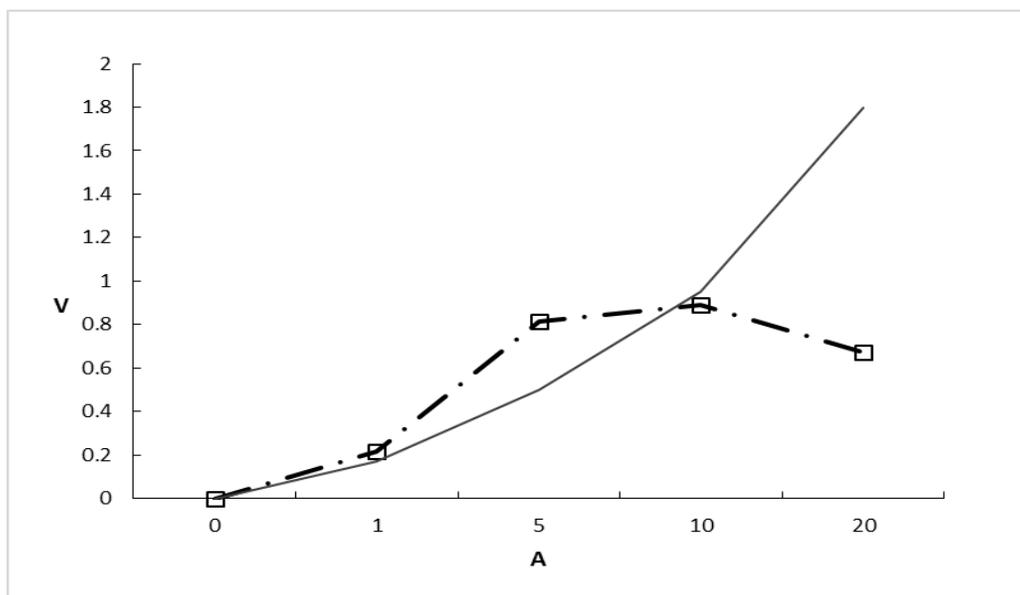
Lacasa (T. versicolor)

```
>gi|636609663:87-134 laccase [Trametes versicolor FP-101664 SS1]
HWHGIFQAGTNWADGAAFVNQCPIATGNSFLYDFTVPDQAGTFWYHSH
>gi|636609663:425-491 laccase [Trametes versicolor FP-101664 SS1]
HPFHLHGHTFSVVRSGSSTFNYPVRRDVTSTGNSGDNVTIRFTTDNPGPWFLHCHIDFHL DAGF
```

Globina (Sprague-Dawley)

```
>gb|AAB30298.1|:31-141 beta 1 globin [rats, Sprague-Dawley, Peptide, 146 aa]
LLVVYPWTQRYFDSFGDLSSASAIMGNPKVKAHGKKVINAFNDGLKHLNKGTF AHLSELHCDKLHVDP
ENFRLLGNMIVIVLGHHLGKEFSPCAQAAFQKVVAGVASAL
```

V.- GRÁFICO DE MODELO DE UNIÓN COOPERATIVA.



Modelo de unión cooperativa con datos teóricos (—). Datos experimentales (- - -) ajustándose a un modelo de unión no cooperativa.

