

## ENSAYOS DE CRECIMIENTO Y DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CEPAS DE GÍRGOLAS (*Pleurotus ostreatus*) DE PATAGONIA

Maximiliano Rugolo<sup>1\*</sup>, Bernardo Lechner<sup>2</sup> y Mario Rajchenberg<sup>3</sup>

1) Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP). CC 14, (9200) Esquel, Chubut, Argentina / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina / Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (SCTyIP), Chubut, Argentina.

2) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN). Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Argentina / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

3) Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP). CC 14 (9200) Esquel, Chubut, Argentina / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

**Resumen:** En el presente estudio se realizaron ensayos de crecimiento *in vitro* de cepas autóctonas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en placas a diferentes temperaturas, y ensayos cualitativos de la enzima ligninolítica lacasa, usando DMP como sustrato, con el objetivo de relevarlas, caracterizarlas y seleccionarlas para desarrollar posteriormente su cultivo en laboratorio sobre virutas y aserrines de *Pinus sp.* Se evaluaron 10 cepas provenientes de bosques de *Araucaria araucana* en el norte de Patagonia. Las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron a 23 °C en todas las cepas ensayadas; la n° MR12517 resultó la más veloz, con una tasa de 0,766 cm/día. A partir del día 4 se detectó la presencia de la enzima lacasa por formación del halo amarillo en todas las cepas de estudio.

**Palabras clave:** lacasa, aserrín, *Pinus sp.*

### Introducción

Los hongos lignocelulolíticos que generan pudrición blanca degradan los componentes principales de las estructuras vegetales como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Kirk & Farrell 1987). Estos hongos poseen enorme potencial en los procesos de biorremediación debido a la capacidad que tienen sus enzimas extracelulares de degradar sustancias tóxicas persistentes en el medio ambiente (Barr & Aust 1994). La búsqueda de hongos capaces de degradar estas sustancias nocivas puede contribuir al saneamiento del medio ambiente mediante un método eficaz y económico frente a los procedimientos químicos y/o físicos que se utilizan para ese fin. El relevamiento de cepas fúngicas útiles mediante métodos colorimétricos permite seleccionar aquellas con mejores características para las aplicaciones de interés.

En la Región Patagónica se encuentra el hongo ligninolítico *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm (Pleurotaceae, Agaricales) que crece sobre troncos de *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch (Araucariaceae) (Lechner *et al.* 2002), una especie comestible y productora de enzimas con interés biotecnológico.

La explotación forestal de la Región Andino Patagóni-

ca genera desechos de aserríos en gran proporción, en su gran mayoría provenientes de forestaciones de *Pinus sp.* y de maderas del bosque nativo. El aserrín tiene poco valor comercial y, tradicionalmente, ha constituido un problema en lo que se refiere a su disposición final desde un enfoque ambientalista. Sin embargo, su utilización como fuente de carbohidratos para la producción de hongos comestibles brinda una solución a su acumulación.

El objetivo del presente trabajo fue relevar, caracterizar y seleccionar cepas de *P. ostreatus* de Patagonia con el fin de desarrollar posteriormente su cultivo en laboratorio sobre las virutas y aserrines de *Pinus sp.*

### Materiales y métodos

#### Organismo

*Pleurotus ostreatus*, Argentina, Neuquén, Villa Pehuenia, Paso Los Arcos, leg. M. Rugolo & M. Rajchenberg, 3/V/2013, MR 12507, 12508, 12509 y 12510; Circuito Pehuenia, Corporación Pulmarí, leg. M. Rugolo & M. Rajchenberg, 3/V/2013, MR 12516 y 12517; Circuito Pehuenia,

\* Autor correspondiente: [mrugolo@ciefap.org.ar](mailto:mrugolo@ciefap.org.ar)

A Remeco leg. A. de Errasti, 12/V/2011, AE 459; Aluminé, Moquehue, leg. J. del Vas, 3/III/1994, CIEFAPcc 104; Parque Nacional Lanín, Sección Tromen, leg. M. Rajchenberg, 20/V/1999, MR 11940 y 11941, CIEFAPcc 287 y 288.

### Crecimiento a diferentes temperaturas

Con el fin de evaluar la temperatura óptima de crecimiento, las cepas fueron inoculadas a 1 cm del borde de cajas de Petri con medio de cultivo AEM (Agar-extracto de malta), e incubadas en oscuridad a 18 °C y 23 °C. Se registró el crecimiento lineal hasta la colonización completa de la placa. La determinación se realizó por triplicado.

### Determinación de la actividad lacasa

Se utilizó como medio de cultivo malta clara agarizada con glucosa al 1 % y DMP (2,6-dimetoxifenol) 1 mM. Se sembró el inóculo en el centro de cajas de Petri de 9 cm de diámetro, y se las incubó a 23 °C en oscuridad. Cada 4 días se midió el diámetro de la colonia y el halo de coloración amarilla producto de la oxidación del DMP. La determinación se realizó por triplicado.

La eficiencia de la actividad enzimática es indicada por el valor R, expresado como el cociente entre el área del halo y el área de la colonia (Ang *et al.* 2011). Valores altos de R indican actividades enzimáticas altas.

## Resultados

### Crecimiento a diferentes temperaturas

Las tasas de crecimiento (cm/día) de las diferentes cepas de *P. ostreatus* resultaron mayores a los 23 °C para todas las cepas ensayadas; la cepa MR12517 fue la que mostró los mayores valores, con una tasa de 0,766 cm/día (Figura 1).

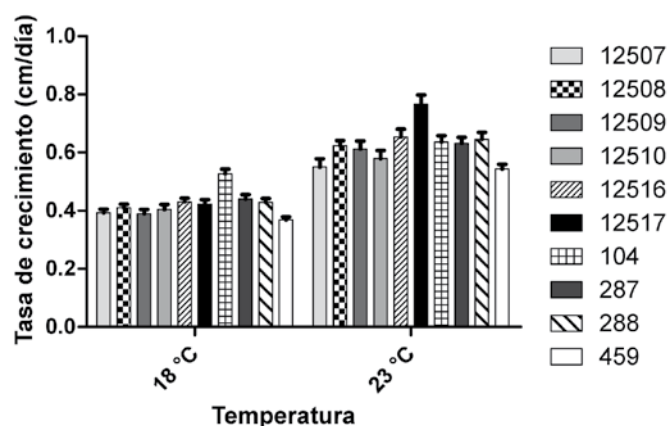


Figura 1: Tasa de crecimiento de cepas de *Postreatus de Patagonia* crecidas a diferentes temperaturas.

### Detección de la actividad lacasa

Las 10 cepas presentaron actividad lacasa, en concordancia con los reportes previos en *P. ostreatus* u otras especies del género como *P. sajor-caju* (Fr.) Singer (Reddy *et al.* 2003). La actividad se evidenció por la formación del halo de coloración amarilla rodeando la colonia fúngica y por el precipitado del DMP.

Los valores de R para cada cepa, a diferentes tiempos (días), se muestran en la Tabla 1. Éstos representan la actividad enzimática ligninolítica; así, a mayores valores de R la actividad resultó mayor. No obstante, altas producciones de biomasa no implican altas actividades enzimáticas (Ang *et al.* 2011), por lo cual, dependiendo del objetivo, se deberán seleccionar aquellas que tengan una u otra característica.

Tabla 1: Diámetros de crecimiento, halo de coloración y valores de R para las diferentes cepas

N° Cepa	Días								
	4			8			11		
	Diámetro crecimiento	Diámetro halo	R	Diámetro crecimiento	Diámetro halo	R	Diámetro crecimiento	Diámetro halo	R
12507	3,23	3,87	1,43	7,37	8,33	1,28	8,5	8,5	1
12508	3,17	3,77	1,41	7,80	8,50	1,19	8,5	8,5	1
12509	3,07	3,97	1,67	7,47	8,50	1,30	8,5	8,5	1
12510	2,57	3,63	2,00	7,30	8,43	1,33	8,5	8,5	1
12516	3,10	3,87	1,56	7,53	8,50	1,27	8,5	8,5	1
12517	2,87	3,70	1,67	7,33	8,50	1,34	8,5	8,5	1
459	3,43	3,93	1,31	7,23	7,73	1,14	8,5	8,5	1
104	3,30	3,77	1,30	7,63	8,50	1,24	8,5	8,5	1
287	3,67	4,10	1,25	7,67	8,50	1,23	8,5	8,5	1
288	2,63	3,47	1,77	6,83	7,83	1,31	8,5	8,5	1

## Conclusiones

Las cepas de *P. ostreatus* de Patagonia tienen la capacidad de oxidar el DMP en el medio ensayado, evidenciando la presencia de actividad lacasa. Con estas características enzimáticas, sumado a la particularidad de crecer naturalmente sobre sustratos resinosos como los fustes de *A. araucana*, y conociendo la temperatura óptima de crecimiento, que resultó ser de 23 °C, se pueden desarrollar cultivos en residuos sólidos como las virutas y aserrines de *Pinus* sp.

Para encarar ensayos de producción, es importante optimizar los tiempos de cada etapa; por este motivo la cepa MR12517 resulta ser la más apropiada por su velocidad de crecimiento durante la incubación.

## Referencias

- Ang, T.N., Ngoh, G.C., Chua, A.S.M., 2011. A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme screening studies. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 6: 589-595.
- Barr, D., Aust, S., 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science Technology* 28: 78-87.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Reviews of Microbiology* 41: 465-505.
- Lechner, B.E., Petersen, R., Rajchenberg, M., Albertó, E., 2002. Presence of *Pleurotus ostreatus* in Patagonia, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, España. pp. 111-114.
- Reddy, G.V., Ravindra Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K.R.R.M., Kothari, I.L., 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* Species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.*, 38: 1457-1462.