DEGRADACIÓN DE COLORANTES TRIFENILMETÁNICOS POR AISLAMIENTOS FÚNGICOS DEL BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO EN VIRUTA DE PINO

Francisco Kuhar[1,*], Sol Villa Nogueyra[2], Gastón Bonamino[2], Santiago Bestene[2] y Matías Herrera[2]

1) Área de Protección Forestal, CIEFAP, Ruta 259 Km 4. CC 14 Esquel (9200), Chubut, Argentina.
2) Colegio Salesiano de San Luis Gonzaga, Esquel.

***Resumen:** Con el fin de obtener cepas fúngicas aptas para la biodegradación de colorantes trifenilmetánicos usando residuos de la producción maderera, se evaluó la capacidad de degradación de los colorantes verde de malaquita y violeta de genciana, por parte de sistemas consistentes en viruta de pino de producción local como medio de cultivo, y aislamientos de hongos del bosque andino patagónico. Las cepas de Agaricus bitorquis, Gymnopilus spectabilis y una bolbitiacea no identificada decoloraron eficientemente, al menos, uno de los colorantes en medio agarizado, y mostraron actividades enzimáticas ligninolíticas. Se obtuvo un alto porcentaje de degradación (a) y detoxificación (b) de verde de malaquita 50 µM por G. spectabilis (a 87 %; b 86 %), por la bolbitiacea (a 95 %; b 93 %) y una cepa de Ganoderma applanatum (a 81 %; b 59 %) del cepario de CIEFAP utilizando el medio viruta luego de 30 días de cultivo.*

***Palabras clave:** Biorremediación, detoxificación, trifenilmetano, violeta de genciana, verde de malaquita.*

Introducción

Los residuos de la producción maderera han sido utilizados tradicionalmente como medio de cultivo para hongos lignocelulolíticos con fines principalmente alimentarios (Stamets 2011). En las últimas décadas, el estudio de las enzimas ligninolíticas ha permitido la aplicación de estos cultivos a la biorremediación de efluentes con contaminantes de diversa naturaleza química (Pointing 2001). En especial, se han obtenido resultados promisorios en la detoxificación de colorantes industriales de la familia de los trifenilmetanos, compuestos de alta toxicidad liberados al ambiente en grandes cantidades por diversas industrias (Azmi *et al. 1998*). A pesar de que se ha comprobado la producción de ligninasas en hongos no causantes de pudrición blanca (Liers *et al. 2011*), ésta no ha sido extensivamente ensayada en procesos de biorremediación de trifenilmetanos. El objetivo de este trabajo es relevar la capacidad degradativa de algunos hongos de diversos nichos ecológicos, con el fin de proponer especies aptas para el escalado de este proceso, utilizando residuos de la explotación maderera.

Materiales y métodos

Los aislamientos procedieron de colecciones realizadas en la provincia del Chubut, en diversos ambientes, y fueron depositados en el cepario personal de F. Kuhar asociados a sus correspondientes ejemplares de herbario. Además se utilizó una cepa de *Ganoderma applanatum* (071) y una de *Fomitopsis minutispora* (109) del cepario del CIEFAP. Los cultivos se mantuvieron en medio agar malta (AM). Se realizaron cultivos en medio agar papa glucosado (APG) con violeta de genciana (VG) 50 µM, y otros con verde de malaquita (VM) 50 µM. Se midió el halo de crecimiento y la decoloración, considerando positivos los casos en los que el halo de degradación fuera observable al día 5. Se evaluó cualitativamente la actividad de la enzima Mn-peroxidasa (MnP) en medio AM con MnCl2. Se cuantificó la actividad lacasa en agar siguiendo el método de Chefetz *et al.* (1998) adaptado a cilindros de agar (en presencia y ausencia de VM) y lignin peroxidasa (LiP) por el método Archibald (1992). Se realizaron cultivos en viruta de *Pinus ponderosa* con un contenido de agua del 70 %, en frascos de 50 ml obturados con algodón. Al agua de hidratación se le agregó glu-

* *Autor correspondiente: fkuhar@ciefap.org.ar*

cosa 1 % para acelerar el crecimiento inicial. La decoloración de la solución de VM 50 µM se llevó a cabo exponiendo un gramo del medio de cultivo de 30 días a 20 ml de solución durante 48 hs. Se cuantificó la degradación del colorante por descenso de absorbancia (621 nm) y la adsorción del mismo a la viruta se cuantificó desorbiendo el colorante con etanol. Para el ensayo de detoxificación se utilizó medio AM con la solución decolorada en concentración 1:2 y se lo inoculó con una cepa de *Phanerochaete velutina* (F017) (cepario F. Kuhar), cuya sensibilidad al colorante fue corroborada previamente en medio AM + VM 25 µM con inhibición completa del crecimiento. Se calculó la detoxificación como porcentaje del crecimiento alcanzado con respecto al control sin VM. Todos los valores indicados corresponden al promedio de tres cultivos independientes.

Resultados

Los hongos aislados fueron identificados como *Agaricus bitorquis* (cepa F011), *Armillaria* sp. (F012), *Phellinus andinopatagonicus* (F013), *Fistulina antarctica* (F014), *Gymnopilus spectabilis* (F015) y un hongo de la familia de las bolbitiaceas (F016) cuya determinación es incierta debido al estado del ejemplar de referencia. El ensayo de decoloración fue positivo en al menos uno de los colorantes para la bolitiacea (BOL), *A. bitoquis* (AGA), *G. spectabilis* (GYM) y, además, para la cepa de *G. applanatum* (GAN).

En la figura 1 se observa el cultivo de *A. bitorquis*, con un halo de decoloración de VG mucho mayor que el de crecimiento. La tabla 1 resume los resultados de los ensayos de decoloración en medio agarizado en ambos colorantes junto con la actividad de la enzima lacasa en presencia y ausencia de VM y la estimación cualitativa de la enzima MnP. La enzima LiP no fue detectada en ninguno de los aislamientos. Sólo se muestran los resultados de las cepas que respondieron de manera positiva en el ensayo de decoloración. No se ve inducción de actividad lacasa por el VM en ningún caso ya que los cultivos en presencia de este colorante no produjeron actividades mayores.

El aislamiento de *A. bitorquis* muestra una altísima capacidad de degradación de ambos trifenilmetanos, reflejándose en la rápida decoloración observada en placa luego de 5 días de crecimiento. Además exhibe una mayor actividad lacasa que los demás aislamientos (68,7 mUEg-1 sin VM y 52,6 mUEg-1 con VM), y reacción positiva de oxidación de manganeso, que permite inferir actividad MnP.

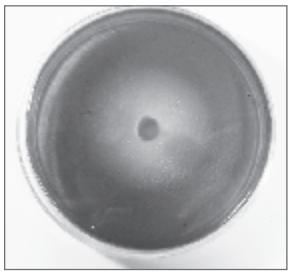

*Figura 1: Halo de decoloración de 5 días por el aislamiento de **A. bitorquis** en medio APG con VG 50 µM.*

El aislamiento correspondiente al ejemplar de la familia de las bolbitiaceas mostró actividad lacasa (7,8 mUEg-1 sin VM y 10,9 mUEg-1 con VM), y evidente actividad MnP.

El medio sólido consistente en viruta de pino con 80 % de contenido de agua, demostró por sí mismo una alta capacidad de adsorción de colorante (Figura 2a). La cepa de *A. bitorquis* no fue capaz de crecer en este medio por lo que no se la utilizó en este ensayo.

En la figura 2a se observa la distribución del colorante verde de malaquita en tratamiento con los medios de cultivo gasta-

Tabla 1: Halos de decoloración de VM y VG (50 µM) de cinco días de cultivo en medio APG, Actividad enzimática lacasa en medio AM con verde de malaquita (VM+) y sin verde de malaquita (VM-) y oxidación de Mn++ en medio AM al día 20.

	Decoloración VM (cm)	Decoloración VG (cm)	Lacasa VM- (mUEg-1)	Lacasa VM+ (mUEg-1)	Oxidación de Mn++
Gymnopilus spectabilis	0,7	0	16,7	13,1	-
Ganoderma applanatum	0,9	0	16,7	16,2	-
Agaricus bitorquis	2,5	2,2	68,7	52,6	+
Bolbitiaceae sp	1,5	0,5	7,8	10,9	++

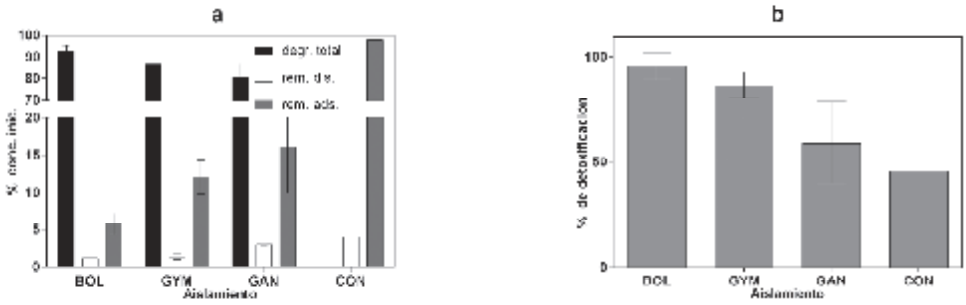

Figura 2: (a) Degradación del colorante VM y remanentes, disuelto (rem. dis.) y adsorbido (rem. ads.) al sustrato sólido; (b) detoxificación como relación porcentual del crecimiento de P. velutina en el medio en cuestión sobre crecimiento en medio sin colorante. En ambos casos el control es el medio viruta sin inocular.

dos. La viruta de pino mostró una alta capacidad para adsorber el colorante, que se recuperó completamente en la elución con etanol. Los tres aislamientos ensayados degradaron significativamente el VM, aunque esta degradación fue significativamente mayor por parte de BOL (95 %). El colorante remanente en solución es significativamente menor en BOL y en GYM.

La figura 2b muestra los resultados del ensayo de detoxificación, con la misma tendencia que en la decoloración. La detoxificación es significativa en la solución decolorada con viruta (control) debido a la remoción del VM, pero es mayor en los tres tratamientos, siendo la mayor detoxificación la de BOL (93 %).

Discusión

La elevada capacidad de la viruta de pino para remover el colorante de la solución indicó que se puede utilizar este medio como adsorbente en el proceso de biorremediación. De todos modos es necesario contar con datos ajustados a una dinámica de adsorción (*e.g.* Kuhar & Papinutti 2013) para parametrizar el proceso. A pesar de esta capacidad, la degradación fúngica es importante ya que la adsorción por sí sola no permite eliminar el colorante. Combinando ambos procesos se podría reutilizar el medio en subsiguientes ciclos de detoxificación (Kasinath *et al.* 2003). La alta actividad degradativa del aislamiento de *A. bitorquis* queda evidenciada por los ensayos enzimáticos y por la velocidad de decoloración in vitro. Su crecimiento deficiente en medios celulósicos es esperable por tratarse de un hongo saprótrofo de suelos, por lo que la búsqueda de un medio de cultivo para este hongo, que muestre a su vez alta capacidad de retención de colorantes en solución, sería de gran utilidad para el escalado de este proceso en biorreactores. En cuanto a los alcances del ensayo de detoxificación, la falta de toxicidad para *P. velutina* no es extensible a animales ni otros organismos, y se realiza principalmente a fines de descartar la formación de la leucobase asociada al verde de malaquita, de igual toxicidad, pero indetectable en el espectro visible. La optimización de la degradación utilizando residuos de la industria maderera local permitiría contar con un medio de bajo costo y enorme potencial, como ocurre con otros sustratos de descarte *e.g.* salvado de trigo (Papinutti *et al.* 2006), y el alto rendimiento de las cepas nativas permitiría su cultivo a gran escala en condiciones semejantes a las ambientales de la región.

Agradecimientos

A la Lic. Patricia Horiszny por su asistencia incondicional. Este trabajo fue financiado por CONICET.

Referencias

Archibald, F.S., 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. Applied and Environmental Microbiology 58(9), 3110-3116.

Azmi, W., Sani, R.K., Banerjee, U.C., 1998. Biodegradation of triphenylmethane dyes. Enzyme and Microbial Technology 22(3), 185-191.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from Chaetomium thermophilium and its role in humification. Applied and Environmental Microbiology 64(9), 3175-3179.

Kasinath, A., Novotný, Č., Svobodová, K., Patel, K. C., Šašek, V., 2003. Decolorization of synthetic dyes by Irpex lacteus in liquid cultures and packed-bed bioreactor. Enzyme and Microbial Technology 32(1), 167-173.

Kuhar, F., Papinutti, L., 2013. Protective effect of vanilloids against chemical stress on the white-rot fungus Ganoderma lucidum. Journal of environmental management 124, 1-7.

Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., Hofrichter, M., 2011 Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech wood. FEMS Microbiology Ecology 78, 91–102.

Papinutti, L., Mouso, N., Forchiassin, F., 2006. Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran – Fomes sclerodermeus. Enzyme and microbial technology 39(4), 848-853.

Pointing, S., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 57(1-2), 20-33.

Stamets, P., 2011. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Random House Digital, Inc. Nueva York.