



## El Colegio de la Frontera Sur

Producción y caracterización de las enzimas del hongo comestible *Auricularia fuscosuccinea* que intervienen en la degradación del contaminante endosulfán

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Alfredo Francisco Yanez Montalvo

2014

## DEDICATORIAS

A mi madre

Berniza Montalvo Velazquez

A mi hermana y sobrina

Claudia lizceet Montalvo Velazquez

Kassandra lizceet Dzul Montalvo

A mi familia

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó en el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) y el Centro de Nanociencias y nanotecnología (Cnyn). Con el apoyo de la beca de maestría número 423466 por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Durante la realización de este trabajo, han sido muchas las personas que han intervenido de manera directa o indirectamente, y a las cuales quiero agradecer:

Al director de tesis Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez por su tiempo, apoyo, confianza y dedicación. Gracias por su amistad y por confiar en un servidor desde el inicio de este camino, además de siempre estar disponible para las dudas y revisiones acerca del trabajo.

Al asesor Dr. Rafael Vazquez Duhalt. Gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y por las enseñanzas que ha compartido, así como alentarme en seguir en este mundo de la ciencia. Gracias de igual manera, por la revisión y las aportaciones dadas para este documento y el artículo.

A los asesores Dra. María de los Ángeles Calixto Romo, por esa sonrisa que se le dibuja al hablar de enzimas, gracias por su amabilidad, observaciones y cercanía. Al Dr. Leopoldo Cruz por permitirme trabajar en su laboratorio, por su asistencia y sugerencias en el escrito.

Al sínodo Dra. Griselda Karina Guillén Navarro, Dra. Reyna Lucero Camacho Morales y M. en C. René Humberto Andrade por sus comentarios y observaciones.

La vida nos permite conocer personas maravillosas como son:

Los amigos, siempre sonrientes, del laboratorio de hongos tropicales en Ecosur. Gracias Lilia Moreno, Rene Andrade, Lucero Camacho y a todos los hermanitos. Los amigos del laboratorio del Cnyn: desde los doctores y estudiantes: Lorena Hernández y, Karla Oyuki, Sergio Águila, Karla Alejo y demás amigos: espero saludarlos pronto.

A los amigos de la generación de maestría y amigos en Chetumal (Karla Infante, Dulce, Crisol, Elizabeth, Franklin, Jonathan, Jorge y Nataly, Holger, Juan Carlos, Nancy y demás amigos), los de orientación en biotecnología y Tapachula (Adriana, Marisol, Salomé, Verónica y Jovani, Liber, Joanna, Rene, Arianne, Wilmar) y mucho más personas que he conocido en este sendero de la ciencia

Gracias

nos saludamos, algún día, bajo este cielo.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS .....	7
2.1. Objetivo General .....	7
2.2 Objetivos particulares.....	7
3. HIPÓTESIS .....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
4.1. Reactivos .....	9
4.2. Material biológico .....	9
4.3. Degradación de endosulfán en medio líquido .....	9
4.4. Actividad enzimática.....	10
4.5. Degradación de endosulfán con el extracto enzimático libre de células .....	11
4.6. Determinación de endosulfán.....	13
4.6.1. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).....	13
4.6.2 Validación del método .....	14
4.7. Producción y purificación enzimática de la cepa ECS-0210. ....	14
4.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	16

4.9. Efecto de la temperatura y pH en la actividad enzimática.....	17
4.10. Ensayos de degradación de endosulfán mediante las fracciones parcialmente purificadas de fenol oxidasa y lacasa.....	17
4.11. Análisis estadístico.....	18
5. RESULTADOS .....	19
5.1. Selección de las cepas con mayor capacidad para la degradación del endosulfán en medio líquido.....	19
5.1.1 Actividad enzimática de los extractos del cultivo de <i>A. fuscosuccinea</i> .....	22
5.2. Ensayo para la degradación del endosulfán mediante el extracto enzimático de las cepas ECS-0201 y ECS-0210 en presencia y ausencia de mediadores .....	23
5.3 Validación de los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).....	25
5.4 Producción y purificación de enzimas fenol oxidasa y lacasa de <i>Auricularia fuscosuccinea</i> ECS- 0210.....	27
5.4.1. Producción enzimática .....	27
5.4.2. Purificación parcial: Precipitación con sulfato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	28
5.4.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	29
5.5. Determinación del peso molecular de las enzimas de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210 .....	33

5.6. Estabilidad temperatura y pH de los extractos con actividad lacasa y fenol oxidasa de <i>A. fuscosuccinea</i> .....	35
5.7. Degradación de endosulfán por las fracciones de alta pureza enzimática..	37
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	38
7. CONCLUSIONES.....	48
8. LITERATURA CITADA.....	50
9. ANEXO.....	62
Anexo1. Técnica para la extracción de Endosulfán residual (Williams, 1984) ...	62
Anexo 2. Manuscrito individual sometido para su publicación en la revista Mycoscience .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción de los tratamientos para evaluar la degradación de endosulfán mediante los extractos enzimáticos libres de células pertenecientes al hongo <i>A. fuscosuccinea</i> .....	13
Tabla 2. Mezcla de reacción de los tratamientos para evaluar la degradación de endosulfán mediante las fracciones de lacasa y fenol oxidasa de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	18
Tabla 3. Producción de Biomasa, valor de pH y consumo de azúcar de las cuatro cepas de <i>A. fuscosuccinea</i> .....	19
Tabla 4. Actividad lacasa (sustrato siringaldazina) y fenol oxidasa (sustrato catecol) del extracto enzimático de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0201 y ECS-0210 en medio líquido en presencia y ausencia de endosulfán.....	22
Tabla 5. Mezcla de reacción y degradación de endosulfán en presencia de mediadores con el extracto de dos cepas de <i>A. fuscosuccinea</i> (ECS-0201 y ECS-0210).....	24
Tabla 6. Parámetros realizados para la validación del método de extracción y cuantificación empleados para el endosulfán.....	26
Tabla 7. Tabla 8. Procedimiento para la purificación de la enzima lacasa de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	32
Tabla 8. Procedimiento para la purificación de enzima fenol oxidasa de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	33



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido de endosulfán en los cultivos líquidos de las cuatro cepas de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0201 y ECS-0210.....	21
Figura 2. Cromatograma típico: alfa endosulfán, beta endosulfán, sulfato de endosulfán.....	26
Figura 3. Producción de lacasa, fenol oxidasa y cantidad de proteína del cultivo líquido de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	27
Figura 4. Perfil de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de las enzimas fenol oxidasa y lacasa presentes en el sobrenadante del hongo <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	29
Figura 5. Cromatografía de intercambio aniónico débil DEAE de las proteínas secretadas por el hongo <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	30
Figura 6. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (High Q) de las proteínas secretadas por el hongo <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	31
Figura 7. Determinación del peso molecular de la enzima fenol oxidasa del cultivo de un litro de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	34
Figura 8. Determinación del peso molecular de la enzima lacasa del cultivo de un litro de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	34
Figura 9. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lacasa de <i>A. fuscosuccinea</i> ECS-0210.....	35

Figura 10. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad fenol oxidasa de *A. fuscosuccinea* ECS-0210.....36

## RESUMEN

El endosulfán es un insecticida organoclorado, considerado como contaminante ambiental ubicuo. El hongo de pudrición blanca *Auricularia fuscosuccinea* degrada este insecticida durante su crecimiento en medio de cultivo líquido, pero se desconocen las enzimas que intervienen en el proceso. El objetivo del presente estudio fue identificar y evaluar la capacidad de degradación de las enzimas ligninolíticas de este hongo comestible. El trabajo se dividió en dos fases, en la primera se realizó una exploración con diferentes cepas de esta especie, para identificar aquella con la capacidad de degradar el endosulfán, la segunda fase consistió en purificar y evaluar las enzimas ligninolíticas más relevantes. La cepa *A. fuscosuccinea* ECS-0210 fue seleccionada para completar el estudio. Se identificaron dos enzimas ligninolíticas (fenol oxidasa y lacasa) en el extracto libre de células del hongo, que posiblemente degraden el endosulfán. En la segunda fase del trabajo se implementó un proceso de purificación que incluyera ambas enzimas. La fracción con actividad lacasa no fue purificada totalmente. Por su parte, la fracción fenol oxidasa fue purificada y correspondió a un peso molecular de 100 kDa. La actividad frente a diferentes rangos de temperatura y pH fue estudiado para cada extracto enzimático. Al evaluar la capacidad de los extractos de alta pureza para degradar el endosulfán, no se obtuvieron porcentajes de degradación superiores a 5%. Los resultados de este trabajo sugieren que las enzimas ligninolíticas de *A. fuscosuccinea* ECS-0210 no intervienen de manera directa en la degradación del insecticida endosulfán y posiblemente la transformación sea realizada por otra enzima o grupo enzimático presente en el extracto libre de células del hongo.

**Palabras clave:** Organoclorados, biorremediación, purificación, fenol oxidasa, lacasa..

## 1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organoclorados (POC) son un grupo peligroso de contaminantes ambientales que representan un serio problema a nivel mundial. Estos compuestos fueron los primeros en ser fabricados a escala industrial y alcanzaron un excesivo uso generalizado (Shi *et al.*, 2009). El endosulfán (6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahidro-6-9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín 3-óxido, CAS No. 115-29-7) patentado en 1956, es un insecticida organoclorado ciclodieno y se emplea mediante una formulación de dos isómeros: alfa y beta, en relación aproximada 70:30, respectivamente (Goswami *et al.*, 2009). En los insectos, el endosulfán actúa bloqueando los canales de cloro (Cl<sup>-</sup>) asociados a los receptores GABA (ácido gamma amino butírico) de las neuronas. El impedimento del paso del anión a través del canal iónico genera a una hiperexcitación neuronal, lo cual causa la muerte en el insecto (Silva y Carr, 2010).

Técnicamente el endosulfán es considerado un contaminante orgánico persistente con propiedades fisicoquímicas de semi-volatilización, lipofílico, de fácil absorción y acumulación (biomagnificación) en órganos de humanos como de animales. El endosulfán tiene una toxicidad aguda por vías orales e inhalatorias, así como ligeramente tóxico por vía dérmica para los organismos superiores, sin embargo, se considera extremadamente tóxico para los peces (en niveles de 1 a 20 ng l<sup>-1</sup>) (Silva y Beauvals, 2010). Los riesgos a la salud humana están asociados a la exposición directa de este compuesto produciendo dolores abdominales y diarrea, además se ha descrito su comportamiento como agente teratógeno y disruptor endocrino (Mnif *et al.*, 2011). A

pesar de los efectos nocivos hacia el hombre y el ambiente, el endosulfán aún es empleado en algunos países debido a su bajo costo, fácil adquisición y su versatilidad en la industria agrícola (Rissato *et al.*, 2006).

En las últimas décadas el endosulfán fue aplicado ampliamente en países de todo el mundo: Australia, Brasil, Canadá, China, Estados Unidos, México y América central (con una aproximación de 409,000 toneladas métricas entre 1946 a 1974), para el control de plagas (insectos y ácaros) en actividades como la agricultura, silvicultura, uso doméstico e industrial (Weber *et al.*, 2010; Desalegn *et al.*, 2011). Para el año 2002 la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) estimó la aplicación de 1.38 millones de libras (626,000 kg) anualmente en Estados Unidos. Debido al uso extensivo, el endosulfán es considerado un contaminante ubicuo ambiental, ya que se encuentra en diferentes ecosistemas en el aire, agua, suelo, sedimentos y en los sitios cercanos y lejanos a la zona de aplicación (Beauvais *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2010).

Entre los países latinoamericanos, México es el mayor consumidor de POC para fines sanitarios y agrícolas (Wong *et al.*, 2010). A pesar que los efectos nocivos del endosulfán han hecho que se prohíba su uso alrededor del mundo, en México este insecticida es empleado en cultivos importantes como algodón, algunas frutas y el café (Damon, 2000). Los trabajos de investigación en el sureste de México de Hernández-Romero y colaboradores (2004), Alegria y colaboradores (2008), Wong y colaboradores (2008 y 2010), reportan para el estado de Chiapas la predominancia de pesticidas organoclorados (DDT y endosulfán) en muestras de agua, aire y suelo. Debido a que la acumulación de los residuos de plaguicidas afecta negativamente la productividad del

suelo, resulta de gran interés el desarrollo de nuevas tecnologías de cultivo que sean amigables con el ambiente, así como la generación de procesos para la desintoxicación del agua y suelo que contengan contaminantes como el endosulfán (Castillo *et al.*, 2011).

México es considerado entre los principales países exportadores y líder de café, junto con Perú, los únicos certificados en la producción de café orgánico. Esta actividad se desarrolla en estados como Chiapas, Veracruz, Oaxaca, entre otros. De manera particular, en Chiapas la producción cafetalera es una importante actividad comercial que representa beneficios económicos tanto para grandes como a pequeños productores, entre los que destacan diferentes grupos de comunidades indígenas (Calo y Wise, 2005). La disminución de contaminantes persistentes (como el grupo de organoclorados) en la agricultura favorecería la condiciones del suelo y en consecuencia la calidad del producto obtenido, además de beneficiar las futuras actividades agrícolas en el estado.

Los primeros mecanismos de saneamiento estuvieron basados en métodos fisicoquímicos (por ejemplo, la incineración), que resultaban ser costosos y muy cuestionados debido a los productos residuales generados, como las emisiones de compuestos tóxicos. Debido a lo anterior, se ha potenciado la aplicación de la biotecnología en la remediación de sitios contaminados. El término biorremediación define al uso de sistemas biológicos (bacterias, hongos, plantas o sus partes) nativos o introducidos, que ofrecen la posibilidad para degradar o neutralizar diversos contaminantes ambientales (Zhang y Qiao, 2002).

Los procesos de biorremediación, a diferencia de los tratamientos fisicoquímicos, son reconocidos como técnicas amigables con el ambiente. Los organismos utilizados son capaces de adaptarse a condiciones extremas (como sitios contaminados de plaguicidas) y durante la remediación no perturban la zona contaminada. Microorganismos como bacterias y hongos, han sido objeto de estudio de grupos de investigación para explorar el potencial biotecnológico en la degradación del endosulfán (Goswami *et al.*, 2009). Otros organismos de los cuales se han realizado diversos trabajos son los hongos de pudrición blanca (HPB), definidos de esta manera por su capacidad de degradar la lignina de la madera. En la transformación de este polímero, los HPB emplean un complejo multienzimático no específico que contiene dos grupos principales de enzimas ligninolíticas como las oxidasas (aril-alcohol oxidasa, fenol oxidasa y lacasa) y peroxidasas (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa) (Mtui, 2012). Debido a la inespecificidad química de las enzimas ligninolíticas, estas son capaces de degradar diferentes moléculas aromáticas, cuya estructura es semejante a las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Por ello, se ha incrementado el interés en la investigación de las enzimas de los HPB, ya que pueden ser aprovechadas en la degradación a moléculas menos tóxicas de una amplia variedad de compuestos considerados como contaminantes ambientales (Bezalel *et al.*, 1997; D'Annibale *et al.*, 2005). De igual importancia, se ha descrito en los HPB la participación de un sistema intracelular multienzimático (citocromo P-450) en la degradación o transformación de contaminantes, basado en reacciones de óxido-reducción (Bezalel *et al.*, 1997; Jauregui *et al.*, 2003).

La degradación o transformación de contaminantes ambientales puede llevarse a cabo

utilizando los hongos en crecimiento o las enzimas purificadas a partir del mismo. En su revisión, Mtui (2012), expone los estudios realizados acerca de la evaluación de enzimas purificadas de los HPB y su potencial para degradar contaminantes ambientales. Se ha documentado que la enzima lacasa purificada es capaz de oxidar compuestos fenólicos y aminas aromáticas, ya que utiliza el oxígeno molecular como aceptor de electrones, y además puede oxidar compuestos aromáticos no fenólicos en presencia de mediadores. El mediador redox es una molécula de bajo peso molecular y actúa como aceptor de electrones durante la reacción de óxido-reducción, esto favorece la oxidación de sustratos que tienen un alto potencial redox (compuestos xenobióticos) y que por su tamaño no pueden ser oxidados sólo por la acción enzimática (Rodríguez *et al.*, 2004)

El estado de Chiapas presenta una gran diversidad de HPB. Andrade-Gallegos y colaboradores (1996) realizaron un estudio sobre el conocimiento de hongos micromicetos en plantaciones de café en el municipio de Tapachula, Chiapas. Los autores reportan que el hongo *A. fuscosuccinea* fue uno de los organismos de mayor predominancia en las zonas evaluadas. *A. fuscosuccinea* es una especie que crece en la madera y posee capacidad ligninolítica al dar resultados positivos en la prueba del colorante Azul brillante Remazol R (Machado *et al.*, 2005). Okino y colaboradores (2000) observaron, a partir de basidiomicetos aislados de bosques tropicales, que algunas cepas de *A. fuscosuccinea* presentaban variaciones fisiológicas en el perfil de sus enzimas ligninolíticas (oxidasas, peroxidasa), por ejemplos en algunas cepas la enzima peroxidasa estaba presente y en otras estaba ausente.

Finalmente, *A. fuscosuccinea* ECS-0210 es una cepa nativa de Chiapas y depositada



en el laboratorio de micología de ECOSUR. Ha sido evaluada como posible organismo degradador de compuestos xenobióticos. Escobar y colaboradores (2002), demostraron que esta cepa posee la capacidad de degradar el insecticida endosulfán, en un periodo de incubación de ocho días. Debido al potencial biotecnológico que representan los hongos ligninolíticos en general y de *A. fuscosuccinea* en particular, es necesario ampliar el conocimiento de las enzimas ligninolíticas de *A. fuscosuccinea* que posiblemente intervienen en la degradación del endosulfán, con la finalidad de encontrar posibles aplicaciones biotecnológicas futuras.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Identificar y caracterizar la actividad de las enzimas ligninolíticas del hongo comestible *Auricularia fuscosuccinea* vinculadas en la degradación del insecticida endosulfán.

### 2.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar la cepa de *A. fuscosuccinea* que demuestre mayor capacidad para la degradación de endosulfán.
2. Cuantificar la actividad de las enzimas ligninolíticas (AAO, FO, Lac, LiP, MnP) durante el crecimiento de *A. fuscosuccinea* en medio de cultivo en presencia de endosulfán.
3. Determinar la capacidad de degradación del endosulfán por el extracto enzimático crudo del hongo.
4. Obtener preparaciones de alta pureza de las enzimas ligninolíticas de *A. fuscosuccinea* vinculadas en la degradación del endosulfán y caracterizar la estabilidad en diferentes valores de temperatura y pH.
5. Evaluar la capacidad de los extractos enzimáticos de alta pureza de *A. fuscosuccinea* en la degradación del endosulfán.

### 3. HIPÓTESIS

Las enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca están asociadas a la degradación de diversos contaminantes ambientales como los son colorantes, hidrocarburos y plaguicidas. Por lo anterior, se considera que al menos uno de los extractos de alta pureza de las enzimas que conforman el sistema ligninolítico del hongo comestible *A. fuscosuccinea* sea capaz de transformar el insecticida endosulfán.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Los estándares (endosulfán alfa y beta), así como los compuestos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), catecol, siringaldazina (SIRI) (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azino) y alcohol veratrílico, hidroxibenzotriazol (1-HBT) utilizados durante la experimentación se obtuvieron de la marca SIGMA-ALDRICH. El estándar sulfato de endosulfán fue de la marca ULTRA SCIENTIFIC y para los ensayos de degradación se empleó el insecticida agrícola marca Thiofixan ® (endosulfán 35%). Por su parte, los solventes como el etanol absoluto, acetonitrilo (J.T. Baker ®) y éter de petróleo fueron grado HPLC.

### 4.2. Material biológico

Se emplearon cuatro cepas de la especie *A. fuscosuccinea* con las claves ECS-0201, ECS-0202, ECS-0210 y ECS-0217, depositadas en la colección micológica de ECOSUR, Tapachula, Chiapas, México. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los organismos tanto en líquido como sólido estaba compuesto de la siguiente manera, por litro: glucosa (2 g), extracto de levadura (5 g) y agar (15 g, para el medio sólido), pH 6.6. Todas las cepas fueron cultivadas en medio sólido durante 7 días, en oscuridad a 26-28°C para posteriormente ser utilizadas en los ensayos de degradación.

### 4.3. Degradación de endosulfán en medio líquido

El primer ensayo para la elección de las cepas de *A. fuscosuccinea* con capacidad para degradar el compuesto endosulfán se llevó a cabo en medio líquido. Los hongos cultivados en caja de Petri sirvieron para preparar el inóculo que consistió en 5 fragmentos de micelio (5 mm de diámetro) colocados en 30 ml de cultivo líquido

contenido en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Estos se mantuvieron a 26-28°C en un agitador orbital a 110 rpm durante siete días. Transcurrido el tiempo, el micelio producido en los matraces así como el sobrenadante se homogenizó (bajo condiciones asépticas) en un mezclador durante 30 segundos. Una vez obtenida la suspensión homogenizada se utilizó un ml para inocular matraces Erlenmeyer con 30 ml de medio líquido. El material fue colocado en agitación (110 rpm a 26-28°C) durante ocho días en condiciones de oscuridad (Nieto-López y Sánchez-Vázquez, 1997). Después de dos días de incubación se agregó a cada matraz 0.5 ml de la solución de endosulfán en una concentración final de 15 ppm.

Durante el proceso de crecimiento se realizaron muestreos por triplicado a los cuatro y ocho días posteriores a la inoculación. Como testigo se hizo crecer el hongo sin endosulfán, además, se incubaron tres matraces con endosulfán sin inocular. Todas las muestras obtenidas fueron filtradas para la determinación de biomasa, consumo de azúcar, actividad enzimática (aril alcohol oxidasa, fenol oxidasa, lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) y la concentración de endosulfán en el medio.

#### **4.4. Actividad enzimática**

La actividad lacasa fue medida utilizando como sustrato la siringaldazina. La mezcla de reacción consistió en solución amortiguadora de fosfatos (100 mM, pH 6.6), siringaldazina 0.19 mM y el extracto enzimático. Se monitoreó el cambio de absorbancia a 530 nm ( $\epsilon_{530\text{nm}} = 64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Manole *et al.*, 2008). La actividad fenol oxidasa se midió por la oxidación de catecol ( $\epsilon_{436\text{nm}} = 3,450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La mezcla de reacción contenía catecol 100 mM, disuelto en amortiguador de fosfato (100 mM, pH 7) y extracto enzimático (Ögel *et al.*, 2006). La actividad aril alcohol oxidasa se determinó

mediante la formación de veratraldehído ( $\epsilon_{310\text{nm}} = 9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) resultante de la oxidación del alcohol veratrílico en amortiguador fosfato (100 mM, pH 6.0) y el extracto enzimático (Muñoz *et al.*, 1997).

La actividad lignina peroxidasa se estimó monitoreando la oxidación dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del alcohol veratrílico a veratraldehído ( $\epsilon_{310\text{nm}} = 9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), en solución amortiguadora de succinato de sodio (20mM, pH 4.0), agregando  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.4 mM y el extracto enzimático, el cambio de absorbancia se leyó a 310 nm (Tien y Kirk, 1983). La actividad de manganeso peroxidasa se ensayó de las siguientes maneras: a) se midió la formación del complejo malonato-Mn (III) dado por la oxidación de Mn (II) a Mn (III) a 270 nm ( $\epsilon_{270\text{nm}} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Wariishi *et al.*, 1992). La mezcla de reacción contenía  $\text{MnSO}_4$  1 mM en malonato de sodio (50 mM, pH 4.5) en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.2 mM y 0.05 ml de extracto enzimático; b) Se determinó la oxidación del colorante Rojo de fenol, para ello, se empleó una solución rojo fenol al 0.01% en amortiguador succinato de sodio (0.1 M, pH 4.5),  $\text{MnSO}_4$  100  $\mu\text{M}$  como sustrato y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.2 mM. La reacción fue detenida adicionando NaOH 5N después de 10 minutos de reacción para leer el incremento de absorbancia a 610 nm ( $\epsilon_{610\text{nm}} = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Paszczynski *et al.*, 1988).

En todos los casos una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto.

#### **4.5. Degradación de endosulfán con el extracto enzimático libre de células**

Del grupo de cuatro cepas de *A. fuscosuccinea*, fueron elegidas dos con las que se continuaron los experimentos del trabajo de investigación. Para este caso se eligieron

las cepas ECS-0201 y ECS-0210, a las cuales se detectaron las actividades de las enzimas ligninolíticas en el sobrenadante libre de células. Dicha actividad correspondía al grupo de enzimas oxidasas y en relación a esto se diseñó el ensayo. El proceso para la obtención de los extractos enzimáticos se obtuvo de acuerdo a lo mencionado en el apartado 4.3. El tiempo final de crecimiento fue de siete días en agitación (110 rpm, 26-28°C) y oscuridad.

La evaluación de la capacidad del extracto enzimático para degradar el endosulfán, se realizó en diferentes mezclas de reacción. La solución amortiguadora de fosfato fue esterilizada en autoclave a 121°C por 25 min y los reactantes ( $\text{MnSO}_4$ , Tween 80, y los mediadores: ABTS y siringaldazina) por filtración con membrana (0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore®). Se consideró como inicio de la reacción la adición del extracto enzimático a cada mezcla de reacción. La muestra control consistió en todos los ingredientes mencionados y el extracto enzimático previamente calentado a 80°C durante 10 min con la finalidad desnaturalizar la enzima.

La reacción para las enzimas oxidasas se realizó en un volumen final de 4 ml en frascos de volumen de 15 ml, la mezcla de reacción contenía la solución amortiguadora de fosfatos (100 mM, pH 6.0), solución de endosulfán 35 ppm y 1 ml del extracto enzimático. Los efectos del ABTS y la siringaldazina se midieron de manera individual. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la tabla 1. El material se colocó en agitación a (110 rpm, 26-28°C) y se tomaron muestras a los cuatro y ocho días.

Tabla 1. Mezcla de reacción de los tratamientos para evaluar la degradación de endosulfán mediante los extractos enzimáticos libres de células pertenecientes al hongo *A. fuscosuccinea* ECS-0201 y ECS-0210.

Tratamiento	Extracto enzimático	Amortiguador 100 mM, pH6.0	Endosulfán (35 ppm)	MnSO <sub>4</sub> (1 mM)	Tween 80 (1%)	ABTS (1mM)	SIRI 5 ppm
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-	+

#### 4.6. Determinación de endosulfán

Para evaluar la degradación del endosulfán se empleó una metodología dispersiva basada en la extracción líquido-líquido, utilizando los solventes acetonitrilo-éter de petróleo en proporciones 2:1, respectivamente (Hernández--Rodríguez *et al.*, 2006). En el anexo1 se describe el procedimiento seguido en cada una de las extracciones realizadas.

##### 4.6.1. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

La cuantificación de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  endosulfán y el metabolito sulfato endosulfán fue realizada mediante un cromatógrafo de gases (CP 3800) acoplado a un espectro de masas (Varian modelo SATURN 2200), equipado con una columna capilar no polar de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno (VF-5MS, Varian, E.E.U.U.). Las muestras se inyectaron en modo "splitless" bajo las siguientes condiciones: la temperatura del inyector fue de 250°C, la rampa de temperatura fue programada: 50°C durante 2 min, luego se incrementó 15°C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar una temperatura final de



280°C. El helio fue utilizado como gas de arrastre a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El tiempo total de la corrida fue de 27.33 min. El espectrómetro de masas operó por la técnica de impacto electrónico (EI) a 70 eV. La identificación de los compuestos se realizó comparando el tiempo de retención de los estándares de endosulfán y el espectro de masas de cada compuesto en un rango de m/z 50-400, en modo de ionización simple (SIM).

#### **4.6.2 Validación del método**

Para garantizar los resultados de las mediciones analíticas realizadas con la metodología de extracción y cuantificación del endosulfán, se llevó a cabo el cálculo de los siguientes parámetros de calidad: Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y porcentaje de recuperación (%R), siguiendo lo establecido por la guía EURACHEM (Fernández-Moreno, *et al.*, 2008). Para la determinación de todos los parámetros se emplearon los estándares de alfa, beta y sulfato endosulfán.

#### **4.7. Producción y purificación enzimática de la cepa ECS-0210.**

Para la purificación enzimática se seleccionó la cepa *A. fuscusuccinea* ECS-0210, de acuerdo a los resultados que más adelante se explican. Se elaboró una cinética de crecimiento en matraces de cuatro litros que contenían un litro de medio de cultivo, registrando los valores correspondientes a la cantidad de proteína extracelular y la actividad enzimática (fenol oxidasa y lacasa), cada 24 horas durante siete días de crecimiento (figura 3). Se definió un protocolo de purificación, primeramente, se detuvo los matraces en crecimiento cada tercer día. Suspendido el movimiento de los matraces, se prosiguió a realizar una centrifugación a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min,

para separar el sobrenadante del paquete celular. Terminado la centrifugación, el sobrenadante fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, este paso se realizó para favorecer la eliminación de los polisacáridos presentes en el sobrenadante mediante precipitación en frío. Transcurrido el lapso de congelación, el sobrenadante fue filtrado en dos ocasiones, la primera en papel Whatman y luego con un filtro de jeringa Millipore de  $1.2\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Con el material filtrado se realizó un fraccionamiento de las proteínas mediante una precipitación secuencial con sulfato de amonio. Para ello, se requirió conocer los porcentajes de saturación donde ambas enzimas de interés (lacasa y fenol oxidasa) se mantenían en solución y los porcentajes de saturación en donde las enzimas precipitaban. Concluidas las pruebas, se implementó dos fraccionamientos, la primera consistió en una saturación al 50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas y luego la solución fue centrifugada a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min. El precipitado se desechó y el sobrenadante se saturó hasta 80% con la sal de amonio, se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas y luego fue centrifugado a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min. Para este paso, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue recolectado en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 60 mM, pH 6.0. Por último, la muestra fue dializada en una membrana de 14 kDa contra una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.0 a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas.

La muestra dializada se hizo pasar a través de una columna cromatográfica de intercambio aniónico débil DEAE-celulosa (dietilaminoetilcelulosa, Bio-Rad laboratorios) ( $30 \times 2\ \text{cm}$ ) con un gradiente de NaCl de 0.0 a 1.0 M en amortiguador 10 mM de fosfatos pH 6.0. Las fracciones que presentaron actividad fenol oxidasa y lacasa fueron

colectadas y concentradas mediante ultrafiltración utilizando una celda Amicon (50 ml de capacidad con una membrana de 10 kDa de corte). Por último, tanto las soluciones con actividad fenol oxidasa y lacasa se sometieron a una cromatografía de intercambio aniónico fuerte utilizando una resina High Q (Bio-Rad laboratorios) (10 × 2 cm), con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en amortiguador 10 mM de fosfatos pH 6.0. De igual manera, las fracciones con actividad fenol oxidasa y lacasa fueron recolectadas para concentrar en una celda Amicon (50 ml de capacidad con una membrana de 10 kDa de corte).

#### **4.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), para obtener el valor del peso molecular de las proteínas (Laemmli, 1970). Los porcentajes de los geles de separación y el de empaquetamiento fueron de 10 y 4%, respectivamente. El SDS se empleó al 10%. El voltaje de la prueba fue de 120 voltios durante 90 min. Transcurrido el tiempo, el gel se tiñó con el reactivo InstantBlue™, por 60 min y luego se eliminó el colorante mediante lavado con agua destilada y en agitación por 20 min.

Se emplearon zimogramas para evidenciar la actividad enzimática de la fracción de alta pureza (lacasa), mediante un gel de poliacrilamida en condiciones no-desnaturalizantes. Los geles de separación y concentrador de la muestra se utilizaron en los mismos porcentajes, se utilizó SDS a baja concentración (0.1%). El amortiguador de carga de muestra contenía: Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8), glicerol al 20%, azul de bromofenol a 0.01% y SDS al 0.1%. Se colocó 20 µl de la muestra concentrada y se aplicó un voltaje de 120 voltios por 90 min. Terminado el tiempo, el gel se sumergió en un amortiguador de

fosfatos (100 mM, pH 6) con 2,6 dimetoxifenol (DMP) 5mM como sustrato para revelar la actividad lacasa. El gel se colocó en agitación hasta la aparición de una mancha de color amarillo debido a la oxidación del DMP por la enzima depositada en el gel.

#### **4.9. Efecto de la temperatura y pH en la actividad enzimática.**

Se evaluó la influencia de la temperatura y el pH en la actividad enzimática de los extractos con actividad lacasa y fenol oxidasa. Para la temperatura se trabajó un rango de 10-60°C, utilizando la mezcla de reacción descrita por Manole y colaboradores (2008) y Ögel y colaboradores (2006), para medir actividad lacasa y fenol oxidasa, respectivamente. Ambas reacciones utilizaron 50 µl de la fracción de alta pureza. La influencia de la temperatura se obtuvo incubando las muestras (amortiguador y extracto enzimático) durante 15 minutos en baño maría, terminado el tiempo, se enfriaron las muestras y se agregó 100 µl de siringaldazina o 250 µl de catecol, para medir la actividad lacasa o fenol oxidasa, respectivamente. La influencia del pH se describió en un rango de 3.0-8.0. Los amortiguadores fueron preparados de acuerdo al valor de utilización, acetatos 100 mM (pH 3.0-5.0) y fosfatos 100 mM (pH 6.0-8.0). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### **4.10. Ensayos de degradación de endosulfán mediante las fracciones parcialmente purificadas de fenol oxidasa y lacasa**

La evaluación de la capacidad de las fracciones parcialmente purificadas de fenol oxidasa y lacasa se realizó en diferentes mezclas de reacción. El volumen final de las pruebas fue de un 1 ml contenido en viales de 4 ml. Los componentes utilizados fueron: solución amortiguadora de fosfato 100 mM pH 6, MnSO<sub>4</sub>, Tween 80, y los mediadores:

(1-HBT) y siringaldazina. Las cantidades y constituyentes de cada mezcla se encuentra en la tabla 2. Como iniciador de la reacción se agregó la fracción parcialmente purificada de las enzimas ligninolíticas, al final de cada mezcla de reacción.

Una vez realizadas las mezclas de reacción el material se colocó en agitación a 110 rpm, 35°C, durante 24 horas. Terminado el tiempo, el contenido de endosulfán se cuantificó mediante un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (Agilent Technologies), empleando una columna de fase reversa ( $\mu$ Bondapak C18), de acuerdo al protocolo modificado de Siddique y colaboradores (2003).

Tabla 2. Mezcla de reacción de los tratamientos para evaluar la degradación de endosulfán mediante las fracciones de lacasa y fenol oxidasa de *A. fuscusuccinea* ECS-0210.

Tratamiento	Enzima	Amortiguador 100 mM pH 6.0	Endosulfán (10 ppm)	MnSO <sub>4</sub> (1mM)	Tween 80 (1%)	1-HBT (1 mM)	SIRI (5 ppm)
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-	+	-
6	+	+	+	-	-	-	+

#### 4.11. Análisis estadístico

En todo caso donde se mencione el análisis estadístico se realizó aplicando el paquete estadístico SAS JMP versión 6. Se utilizaron los promedio para el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación múltiple de medias empleando la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Selección de las cepas con mayor capacidad para la degradación del endosulfán en medio líquido.

La primera evaluación consistió en identificar una cepa de *A. fuscossuccinea* capaz de degradar el endosulfán. De igual importancia, fue determinar las enzimas ligninolíticas producidas por las cepas bajo las condiciones de cultivo establecidas, para vincular la actividad enzimática con la degradación del endosulfán.

Tabla 3. Producción de biomasa, valor de pH y consumo de azúcar de las cuatro cepas de *A. fuscossuccinea* después de ocho días de incubación a 26–28°C, en medio líquido a 110 rpm y pH 6.6. Media de tres repeticiones y desviación estándar.

Cepa	Biomasa, (g/l)	pH	Consumo de azúcar (%)
ECS-0201	0.5 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.06 <sup>a</sup>	35.2 ± 0.05 <sup>a</sup>
ECS-0202	1.4 ± 0.01 <sup>b</sup>	8.1 ± 0.10 <sup>b</sup>	87.3 ± 0.02 <sup>b</sup>
ECS-0210	0.8 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.15 <sup>a</sup>	47.5 ± 0.04 <sup>c</sup>
ECS-0217	1.6 ± 0.01 <sup>b</sup>	8.4 ± 0.15 <sup>b</sup>	88.0 ± 0.01 <sup>b</sup>

- Letras iguales en una misma columna indican que no hay diferencias significativas entre cepas, según la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

En la tabla 3 se reportan los valores después de ocho días de cultivo de la producción de biomasa, el cambio de pH y el consumo de azúcar de las cepas estudiadas. Los datos muestran que el proceso de cultivo, bajo las condiciones establecidas, favoreció una mayor producción de biomasa por parte de las cepas ECS-0202 (1.4 g/L) y ECS-

0217 (1.6 g/L). Estos dos organismos también fueron los que consumieron en mayor porcentaje la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo (87.3 y 88%, respectivamente). Por su parte, las cepas ECS-0201 y ECS-0210, no presentaron un cambio de pH considerable y el consumo de azúcar de 35 y 47%, respectivamente. El análisis estadístico para los cuatro hongos y su respuesta a los parámetros medidos (ANOVA y prueba Tukey), encontró que entre las cepas ECS-0201 y ECS-210, así como ECS-202 y ECS-217, generalmente no hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). Por otra parte, en todos los casos cuando se compararon las cepas ECS-201 y ECS-210 contra ECS-202 y ECS-217 se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

En el ensayo sobre la degradación del endosulfán en medio líquido, las cuatro cepas de *A. fuscosuccinea* demostraron la capacidad para reducir más de 90% la concentración inicial del insecticida en ocho días de exposición, bajo las condiciones de cultivo establecidas. La figura 1, presenta el contenido de endosulfán en las muestras de cuatro y ocho días, así como la concentración final del sulfato de endosulfán (ocho días), principal metabolito que se genera en la degradación del insecticida por la vía oxidativa (Shivaramaiah y Kennedy, 2006). Las cepas ECS-0210 ( $\alpha=42\%$  y  $\beta=50\%$ ) y ECS-0217 ( $\alpha=57\%$  y  $\beta=61\%$ ) degradaron más de 40% del endosulfán a los cuatro días de incubación. A los ocho días de crecimiento de los hongos en presencia de endosulfán las cuatro cepas demostraron transformar el insecticida 94–100%. El análisis estadístico demostró que las cepas ECS-0210 y ECS-0217 presentaban una diferencia significativa en la relación al contenido de endosulfán del control al cuarto día del ensayo de degradación ( $P < 0.05$ ). La comparación de medias a los ocho días de la degradación de endosulfán, se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) de las

cuatro cepas del hongo *A. fuscosuccinea* en comparación con el contenido de endosulfán del control. Residuos de compuestos isómeros fueron detectados en las muestras, el  $\beta$ -endosulfán en las muestras ECS-0201, ECS-0202 y ECS-0217, en tanto la cepa ECS-0210 se detectó restos del compuesto  $\alpha$ -endosulfán. Con respecto al sulfato endosulfán, sólo se cuantificó de manera considerable en el cultivo de la cepa ECS-0217 (17 ppm). Las demás cepas presentaron residuos de este compuesto e inclusive no fue detectado, como en el caso de la cepa ECS-0210.

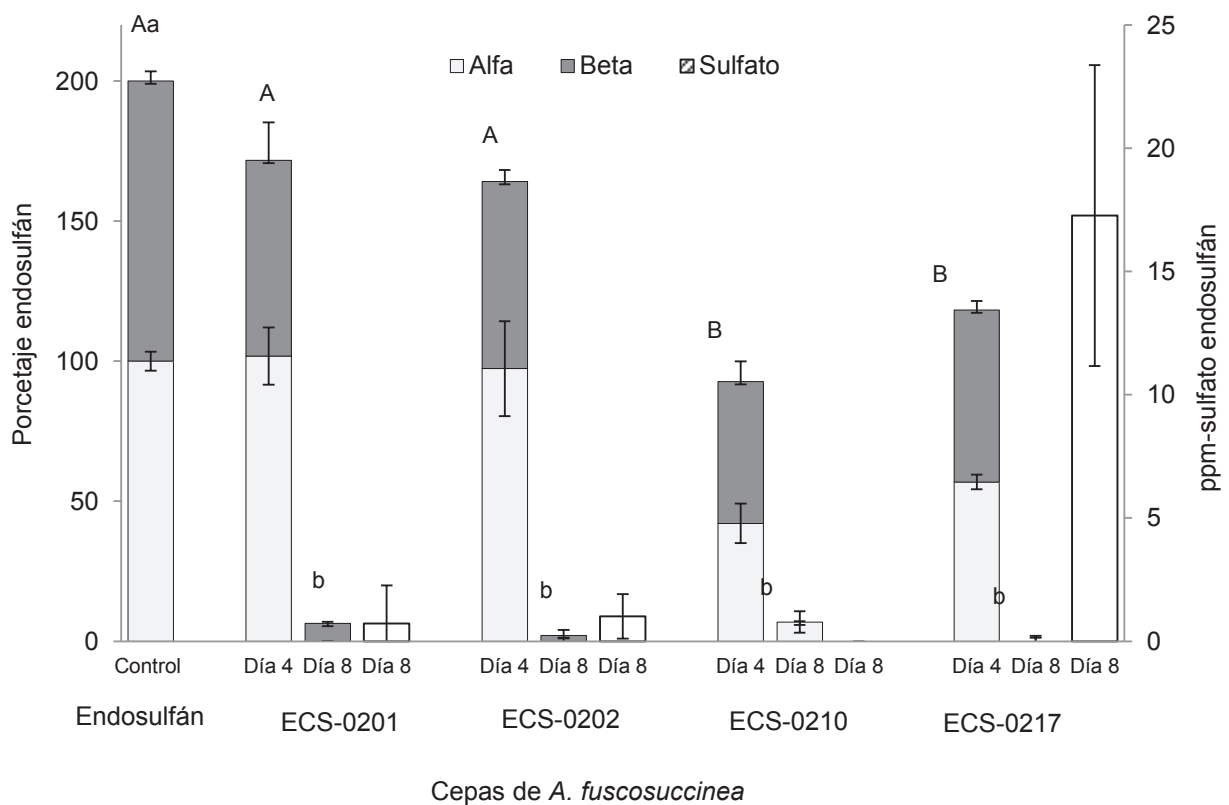


Figura 1. Contenido de endosulfán en los cultivos líquidos de las cuatro cepas de *A. fuscosuccinea*, después de 4 y 8 días de incubación a 26–28°C y 110 rpm. Concentración del metabolito sulfato de endosulfán (8 días). Media de dos repeticiones y desviación estándar. \* Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Comparación entre el control y las cepas los días cuatro (letras mayúsculas) y ocho (letras minúsculas) de degradación.



### 5.1.1 Actividad enzimática de los extractos del cultivo de *A. fuscosuccinea*

Terminado el proceso de crecimiento se obtuvo el sobrenadante libre de células de cada hongo para determinar la actividad de diferentes enzimas ligninolíticas. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de las enzimas lacasa y fenol oxidasa sólo en los extractos enzimáticos de las cepas ECS-0201 y ECS-0210 (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad lacasa (sustrato siringaldazina) y fenol oxidasa (sustrato catecol) del extracto enzimático de *A. fuscosuccinea* ECS-0201 y ECS-0210 en medio líquido en presencia y ausencia de endosulfán, 26–28°C. Media de tres repeticiones.

Enzima	Cepa	Extracto sin endosulfán	Extracto en presencia de endosulfán	
		U/ml		
		7 días	4 días	8 días
Lacasa	ECS-0201	38.6 <sup>Aa</sup>	1.18 <sup>Ab</sup>	7.2 <sup>Ac</sup>
	ECS-0210	5.8 <sup>Ba</sup>	0.06 <sup>Bb</sup>	0.2 <sup>Bc</sup>
Fenol oxidasa	ECS-0201	366.4 <sup>Aa</sup>	2.32 <sup>Ab</sup>	6.9 <sup>Ac</sup>
	ECS-0210	308.4 <sup>Ba</sup>	4.64 <sup>Bb</sup>	4.6 <sup>Bb</sup>

- Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Letras mayúsculas en la misma columna corresponden a la comparación entre cepas, para cada enzima; letras minúsculas en la misma fila corresponde a la comparación entre los días de una misma enzima y cepa.

Para ambas actividades enzimáticas, el extracto de la cepa ECS-0201 obtuvo valores más altos de actividad que la cepa ECS-0210, el ANOVA de estas medias demostró diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en la comparación de la actividad enzimática de cada cepa en el día de medición. Las enzimas ligninolíticas peroxidasas evaluadas (lignina

peroxidasa y manganeso peroxidasa) no fueron detectadas en ninguna de las cuatro cepas estudiadas. A pesar que en las cepas ECS-0202 y ECS-0217 no se detectó actividad enzimática ligninolítica mediante las técnicas espectrofotométricas utilizadas, disminuyeron la concentración de endosulfán a los ocho días de crecimiento en medio líquido.

Por lo anterior, dado que las cuatro cepas estudiadas lograron disminuir el contenido inicial de endosulfán en el medio, el siguiente criterio fue seleccionar las cepas donde se detectó la presencia de enzimas ligninolíticas por las técnicas empleadas. Se decidió evaluar en los siguientes ensayos únicamente los sobrenadantes libres de células de las cepas ECS-0201 y ECS-0210, las cuales disminuyeron el endosulfán a los ocho días de crecimiento y poseen actividad enzimática (fenol oxidasa y lacasa) en su extracto extracelular.

## **5.2. Ensayo para la degradación del endosulfán mediante el extracto enzimático de las cepas ECS-0201 y ECS-0210 en presencia y ausencia de mediadores**

Para relacionar la transformación del endosulfán a las enzimas extracelulares se realizó el ensayo de degradación de endosulfán con el sobrenadante libre de células. Las mezclas de reacción utilizadas y el efecto del extracto enzimático de las cepas ECS-0201 y ECS-0210 sobre el porcentaje de endosulfán se muestran en la tabla 5. El sobrenadante libre de células de la cepa ECS-0210 demostró una mayor degradación del endosulfán en comparación con los porcentajes obtenido por la cepa ECS-0201.

Tabla 5. Mezcla de reacción y degradación de endosulfán en presencia de mediadores con el extracto de dos cepas de *A. fuscusuccinea* (ECS-0201 y ECS-0210) a los cuatro y días de incubación a 26–28°C y 110rpm. Los componentes de cada tratamiento se resumen en el apartado 4.5. Media de dos repeticiones y desviación estándar.

Extracto	Tratamiento	Degradación endosulfán (%)		
		4 días		
		$\alpha$	$\beta$	
201	1	0 ± 3	0 ± 3	Aa
201	2	20 ± 2	18 ± 3	Aa
201	3	36 ± 4	38 ± 7	Aa
		8 días		
201	1	24 ± 0	0 ± 0	Ab
201	2	11 ± 2	37 ± 0	Ab
201	3	25 ± 3	16 ± 1	Ab
		4 días		
210	1	79 ± 1	69 ± 1	Bc
210	2	98 ± 2	91 ± 0	Bc
210	3	80 ± 1	80 ± 0	Bc
		8 días		
210	1	76 ± 0	89 ± 1	Bc
210	2	85 ± 0	80 ± 3	Bc
210	3	78 ± 0	77 ± 0	Bc

- Tratamiento 1: Extracto enzimático, amortiguador (100 mM, pH 6), endosulfán (35 ppm), MnSO<sub>4</sub> (1 mM) y Tween 80 (1%).
- Tratamiento 2: Extracto enzimático, amortiguador (100 mM, pH 6), endosulfán (35 ppm), MnSO<sub>4</sub> (1 mM), Tween 80 (1%) y ABTS (1 mM).
- Tratamiento 3: Extracto enzimático, amortiguador (100 mM, pH 6), endosulfán (35 ppm), MnSO<sub>4</sub> (1 mM), Tween 80 (1%) y siringaldazina (5 ppm).
- Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Letras mayúsculas corresponden a la comparación de degradación entre las cepas. Letras minúsculas corresponde a la comparación de la degradación los días cuatro y ocho entre las cepas.

La cepa ECS-0210, presentó una mayor disminución de la concentración del endosulfán a partir del cuarto día de haber iniciado el ensayo. No se detectó la presencia del metabolito sulfato de endosulfán en ninguna de las mezclas de reacción evaluadas. Este resultado es similar al encontrado cuando se realizó la prueba de degradación de endosulfán en presencia del hongo *A. fuscusuccinea* (sección 5.1). De acuerdo con los resultados de la prueba de ANOVA se determinaron diferencias significativas entre los porcentajes para la degradación de endosulfán por las cepas utilizadas ( $P < 0.05$ ), esclareciendo que la cepa ECS-0210 resultó como la mejor cepa utilizada. Al realizar la comparación entre los tratamientos evaluados en la cepa ECS-210 (ABTS, siringaldazina) con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), se determinó que no existe diferencia en los porcentajes de transformación de endosulfán encontrados en los dos tiempos de medición.

### **5.3 Validación de los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)**

En lo que respecta a la validación del método para determinar la concentración de endosulfán en los ensayos realizados, datos como: tiempo de retención (TR), porcentaje de recuperación y límites (detección (LD), cuantificación (LC)) del compuesto endosulfán (alfa y beta y sulfato) se presentan en la tabla 6. Los porcentajes de recuperación obtenidos son aceptables (80–100%). En un cromatograma típico se puede observar que los compuestos se identifican con una buena resolución (figura 2). Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo mediante generación de una curva de calibración utilizando los estándares correspondientes para cada compuesto, cuya regresión lineal fue equivalente a 0.99.

Tabla 6. Parámetros realizados para la validación del método de extracción y cuantificación empleados para el endosulfán.

Compuesto	TR (min)	Recuperación (%)	Regresión lineal	LD (mg l <sup>-1</sup> )	LC (mg l <sup>-1</sup> )
α-endo	158.8	85–115	0.99	0.6	2.1
β-endo	16.6	83–117	0.99	1.7	2.3
Sulfato-endo	17.1	80–120	0.99	2.8	3.48

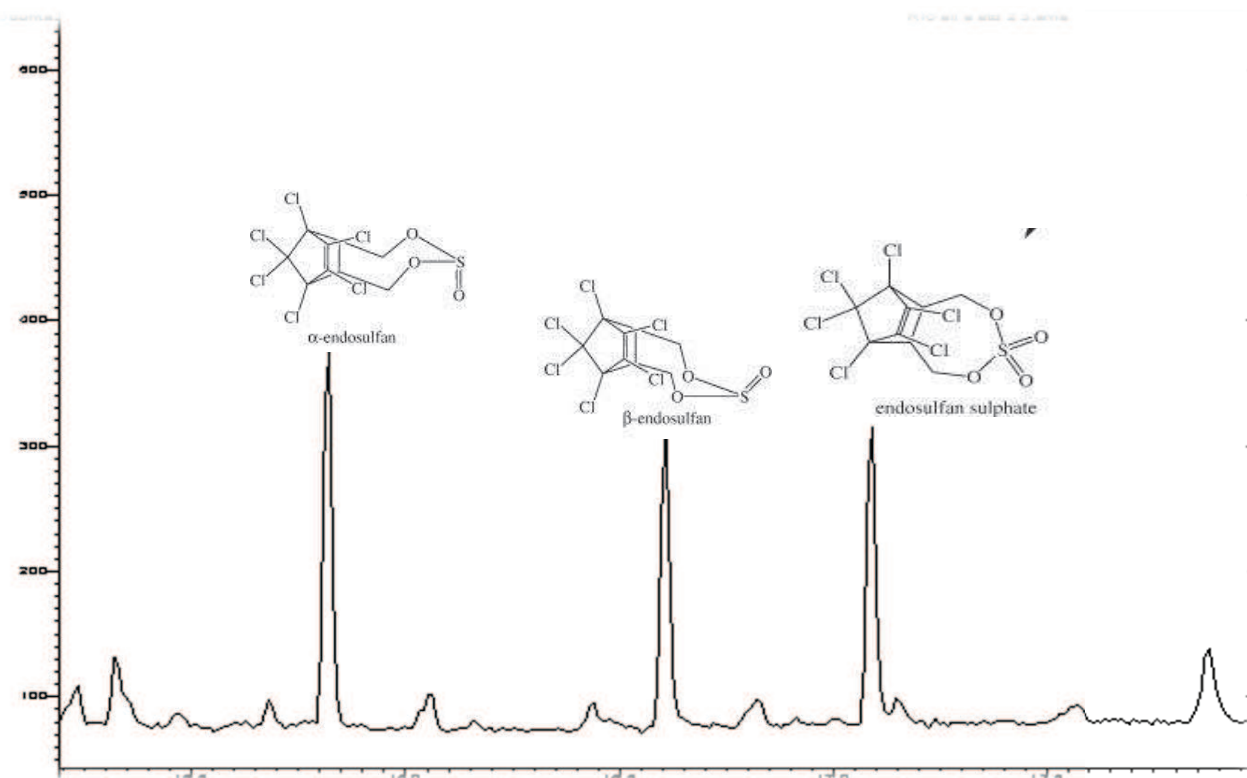


Figura 2. Cromatograma típico: α-endosulfán (TR: 15.8 min), β-endosulfán (TR: 16.6 min), sulfato de endosulfán (RT: 17.08 min). Cada inyección se realizó utilizando 1 µl de una solución de los compuestos en análisis.

## 5.4 Producción y purificación de enzimas fenol oxidasa y lacasa de *Auricularia fuscosuccinea* ECS- 0210.

### 5.4.1. Producción enzimática

Se realizó un cultivo en matraces de un litro de medio líquido que contenía glucosa 2 g y extracto de levadura 5 g, durante siete días a 26–28°C y 110 rpm para monitorear la actividad enzimática (fenol oxidasa y lacasa) de *A. fuscosuccinea* ECS-0210. La figura 3 muestra el contenido de proteína y la actividad enzimática (fenol oxidasa y lacasa) observadas durante el proceso. La actividad fenol oxidasa mostró un pico de máximo de producción en el día cuatro de incubación (178 U/ml), mientras que por su parte para la actividad lacasa presentó un pico máximo de producción al tercer día de crecimiento (26 U/ml).

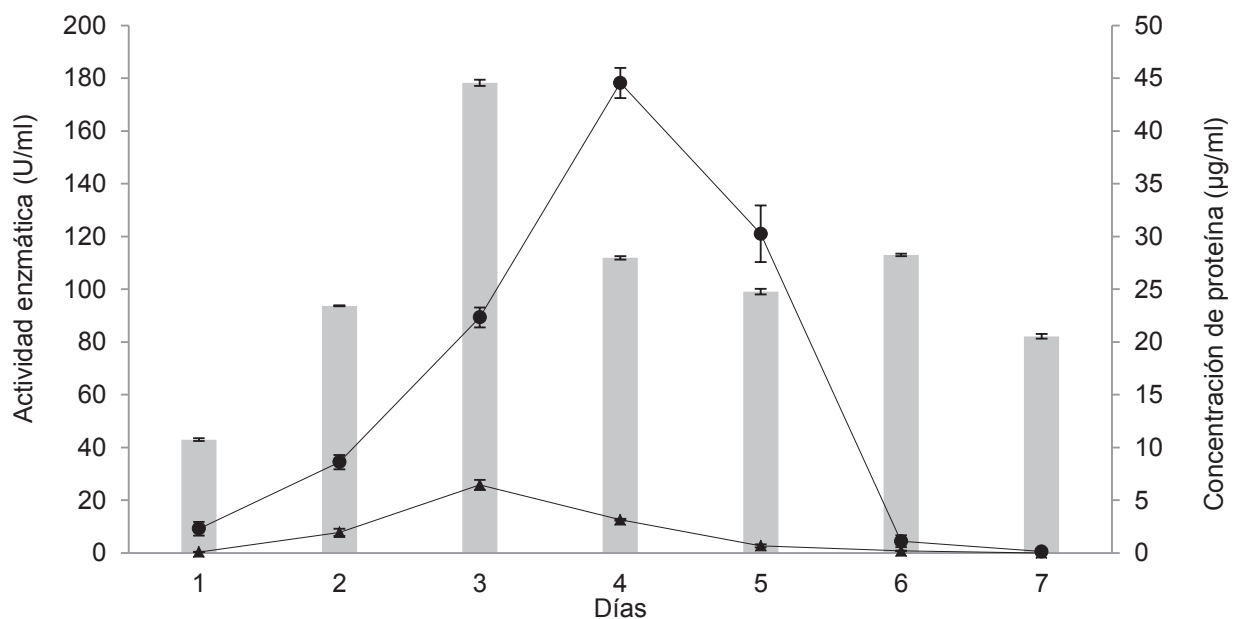


Figura 3. Producción de lacasa (▲), fenol oxidasa (●) y concentración de proteína del sobrenadante libre de células (barras grises) del cultivo líquido de *A. fuscosuccinea* ECS-0210, en matraz de un litro de medio de cultivo (2 g de glucosa, 5 g extracto de levadura), durante 7 días a 110 rpm y 26–28°C. Media de tres repeticiones y desviación estándar.

Con la finalidad de unificar tanto la producción enzimática como el protocolo de purificación, se decidió detener los cultivos cada tercer día de crecimiento, ya que presenta el máximo de actividad lacasa y un valor considerable de actividad fenol oxidasa. Para el día tres, se encontró la mayor cantidad de proteínas extracelulares en el medio de cultivo líquido.

#### **5.4.2. Purificación parcial: Precipitación con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

El primer paso de purificación consistió en un fraccionamiento del cultivo filtrado mediante la precipitación con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La figura 4 muestra los porcentajes de saturación con la sal y la actividad enzimática de las enzimas ligninolíticas. La enzima fenol oxidasa permanece en solución (esto se evidenció al medir actividad enzimática) hasta 50% de saturación con la sal. Una saturación mayor a 50% precipita la enzima fenol oxidasa en la solución, de tal manera que disminuye su actividad catalítica. Un comportamiento similar ocurre para la enzima con actividad lacasa. Por tanto, se decidió tratar el filtrado con dos cortes mediante la agregación de la sal de amonio, el primero a 50% y el segundo a 80% de saturación, para favorecer la separación de las enzimas ligninolíticas de las demás proteínas presentes en el filtrado.

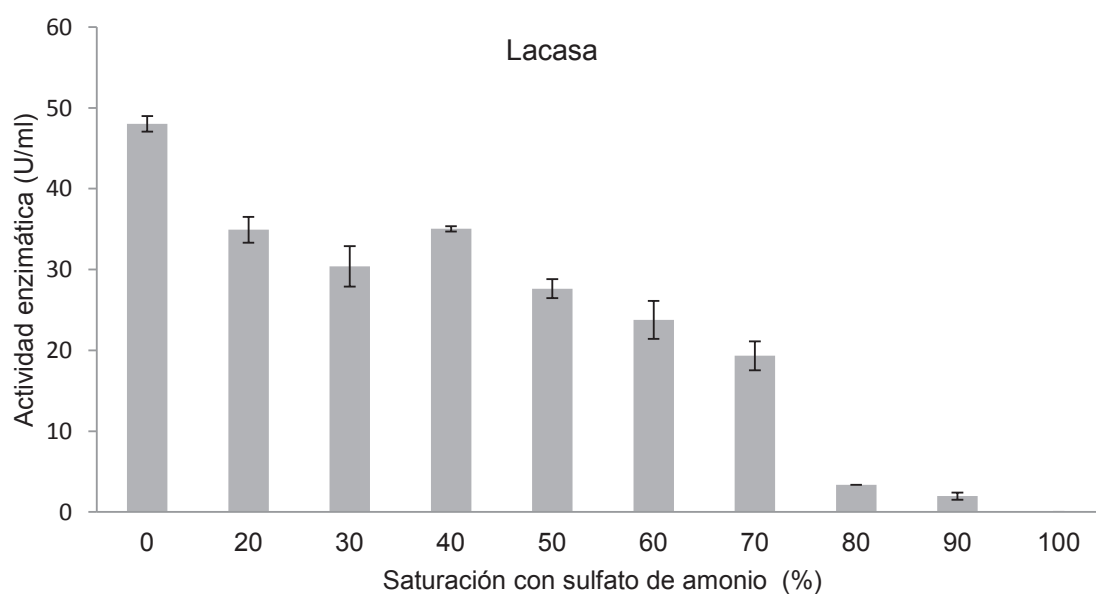
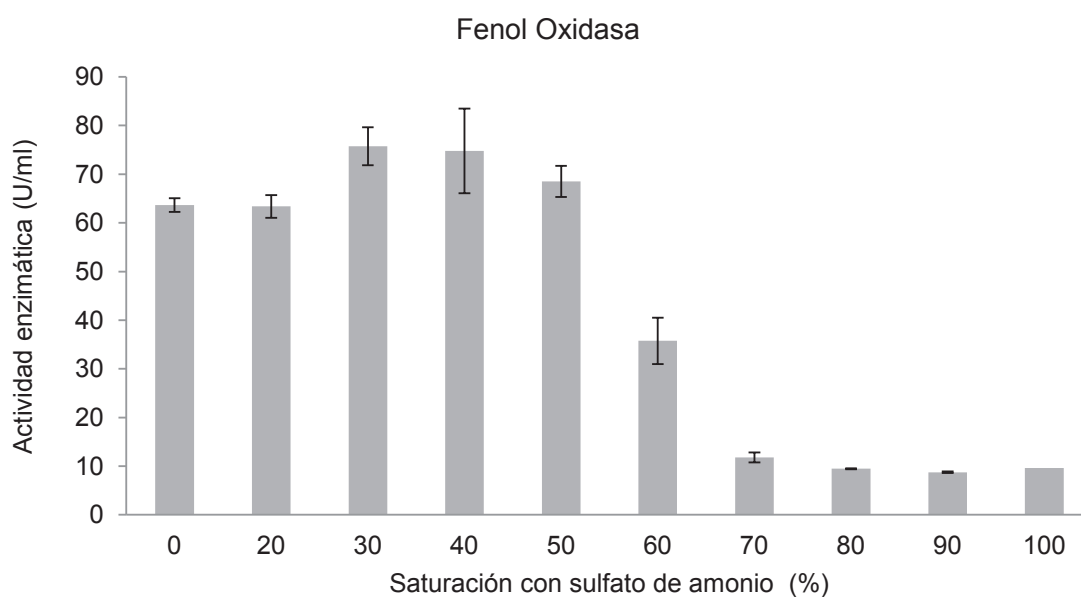


Figura 4. Perfil de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de las enzimas fenol oxidasa y lacasa presentes en el sobrenadante del hongo *A. fuscosuccinea* ECS-0210. Media de tres repeticiones y desviación estándar.

### 5.4.3. Cromatografía de intercambio iónico

Para llevar a cabo la purificación, se empleó una cromatografía de intercambio



aniónico débil DEAE, con la muestra obtenida a partir del extracto dializado. La figura 5 muestra el perfil de elución de las proteínas presentes en la muestra del hongo *A. fuscosuccinea*. La elución de la enzima lacasa se da en la fracción 11, por su parte, la enzima fenol oxidasa se aprecia en el pico de la fracción 9. Con la absorción a la longitud de onda de 280 nm de la columna DEAE-celulosa se observa la presencia de otras proteínas extracelulares que pueden ser consideradas como isoformas o proteínas de no interés. Las fracciones con actividad, tanto lacasa y fenol oxidasa, fueron colectadas y concentradas, y se realizó una cromatografía de intercambio aniónico fuerte (High Q).

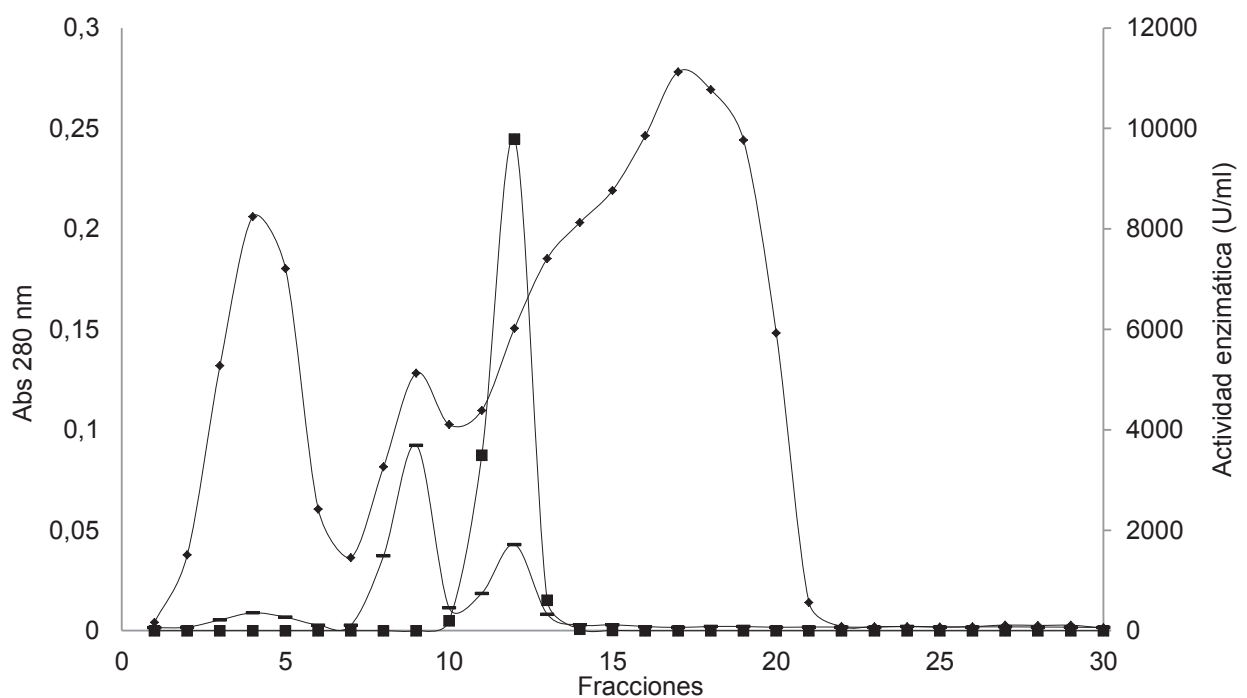


Figura 5. Cromatografía de intercambio aniónico débil DEAE (30 x 2 cm) de las proteínas secretadas por el hongo *A. fuscosuccinea* ECS-0210, a partir de un litro de medio de cultivo. Lectura de absorción de las fracciones a 280 nm de absorbancia (●), actividad lacasa (■) y fenol oxidasa (-) (U/ml).

La figura 6 contiene los dos perfiles de elución de las muestras a través de la columna de intercambio aniónico fuerte (High Q) (10 × 2 cm).

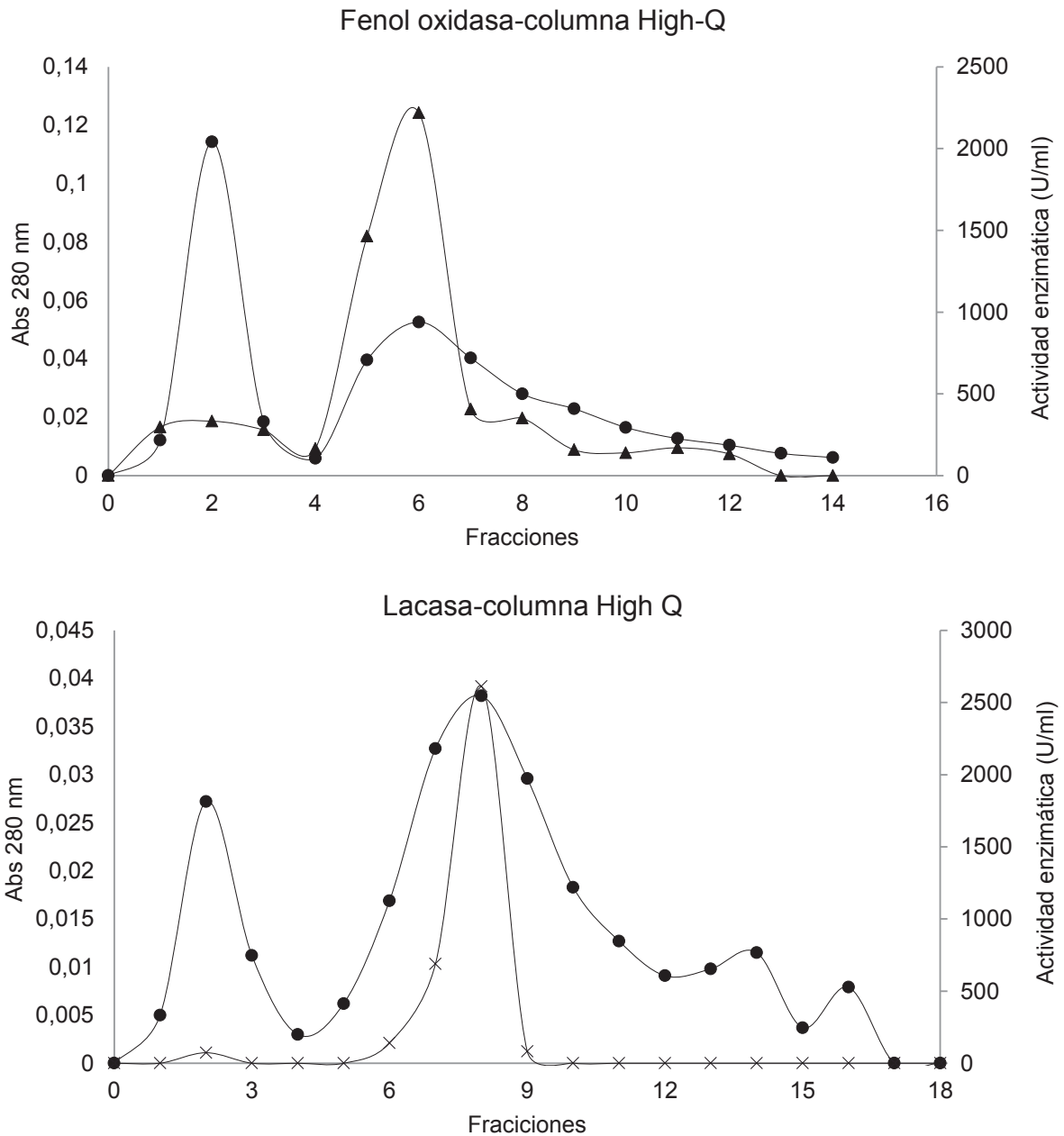


Figura 6. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (High Q) (10 x 2 cm) de las proteínas secretadas por el hongo *A. fuscosuccinea* ECS-0210, a partir de un litro de medio de cultivo, lectura de absorción de las fracciones a 280 nm de absorbancia (●), fenol oxidasa (▲) y actividad lacasa (×) U/ml.

Para el caso de la actividad fenol oxidasa se observa un pico conformado con las fracciones cinco y seis. Para el caso de la actividad lacasa corresponde para las fracciones siete y ocho. Todas las fracciones con actividad fueron reunidas y concentradas en un equipo Amicon.

Todos los resultados obtenidos en cada paso del protocolo de purificación de la enzima lacasa y fenol oxidasa, se resumen en las tablas 7 y 8, respectivamente. Para ambos casos, se observa una pérdida de la proteína total, característica dada en los procesos de purificación. Mediante la utilización del protocolo de purificación se logró obtener una fracción con actividad lacasa hasta 388 veces más purificada y un rendimiento de 26% y la fenol oxidasa hasta de 44.78 veces con un rendimiento de 2.39%.

Tabla 7. Procedimiento para la purificación de enzima lacasa de *A. fuscusuccinea* ECS-0210 producida a partir de 1 L de medio de cultivo.

Etapa	Volumen total (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (µg/ml)	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad (%)	Factor de purificación
Fermentación	1000	26	45	26000	45	0,58	100	1
Filtrado	990	55	30	54450	29,7	1,83	209,42	3,17
Extracto dializado	35	7475	343	261625	12,005	21,79	1006,25	37,72
Cromatografía DEAE	2	28745	534	57490	1,068	53,83	221,12	93,17
Cromatografía High Q	0,75	8966	40	6724,5	0,03	224,15	25,86	388

Tabla 8. Procedimiento para la purificación de enzima fenol oxidasa de *A. fuscosuccinea* ECS-0210 producida a partir de 1 L de medio de cultivo.

Etapa	Volumen total (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína ( $\mu\text{g/ml}$ )	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg )	Actividad (%)	Factor de purificación
Fermentación	1000	89	45	89000	45	1,98	100	1
Filtrado	990	133	30	131670	29,7	4,43	147,94	2,24
Extracto dializado	35	1916	343	67060	12,005	5,59	75,35	2,82
Cromatografía DEAE	2	10030	513	20060	1,026	19,55	22,54	9,89
Cromatografía High Q	0,75	2834	32	2125,5	0,024	88,56	2,39	44,78

### 5.5. Determinación del peso molecular de las enzimas de *A. fuscosuccinea* ECS-0210

Se realizaron geles de poliacrilamida para verificar la pureza de las proteínas de interés en cada paso del protocolo de purificación. Para el caso de la enzima fenol oxidasa, se obtuvo una proteína de alto grado de pureza, con un peso molecular de 100 kDa (figura 7). Por su parte, la figura 8 muestra un PAGE en condiciones no desnaturizantes y un zimograma revelado con DMP de la fracción con actividad lacasa. La máxima actividad enzimática se revela en un peso molecular de 50 kDa, donde están las bandas de menor porcentaje, por lo cual, se considera que no posee un alto grado de purificación.

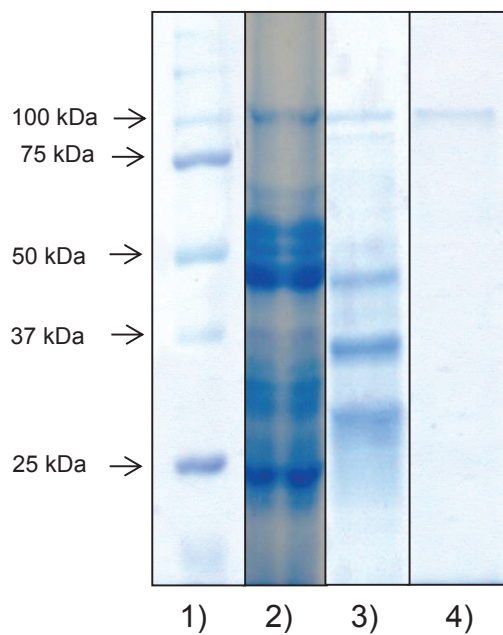


Figura 7. Determinación del peso molecular de la enzima fenol oxidasa del cultivo de un litro de *A. fuscosuccinea* ECS-0210. 1) Marcador de peso molecular 2) Extracto dializado 3) fracción fenol oxidasa DEAE-celulosa 4) fracción con actividad fenol oxidasa High Q.

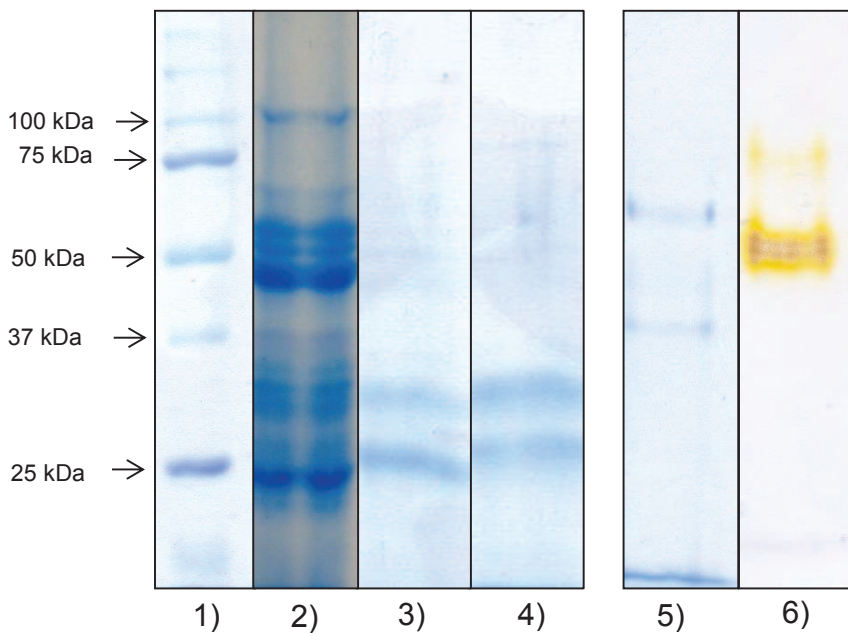


Figura 8. Determinación del peso molecular de la enzima lacasa del cultivo de un litro de *A. fuscosuccinea* ECS-0210. 1) Marcador de peso molecular, 2) Extracto dializado, 3) fracción lacasa DEAE-celulosa, 4) fracción lacasa High Q, 5) fracción lacasa nativa High Q, 6) Zimograma actividad lacasa utilizando DMP como sustrato.

### 5.6. Estabilidad temperatura y pH de los extractos con actividad lacasa y fenol oxidasa de *A. fuscosuccinea*.

Las figuras 9 y 10 muestran el efecto de la incubación a diferentes temperaturas y el pH sobre la actividad lacasa y fenol oxidasa del extracto utilizado. La actividad lacasa tiene un rango estable de 20–40°C, con valor promedio de 1,223 U/ml. La actividad fenol oxidasa incrementa gradualmente conforme aumenta la temperatura, encontrando su valor máximo a 40°C y una actividad de 6,956 U/ml. Para ambos casos, a 60°C se pierde actividad enzimática, probablemente porque a esta temperatura las enzimas se desnaturalizan.

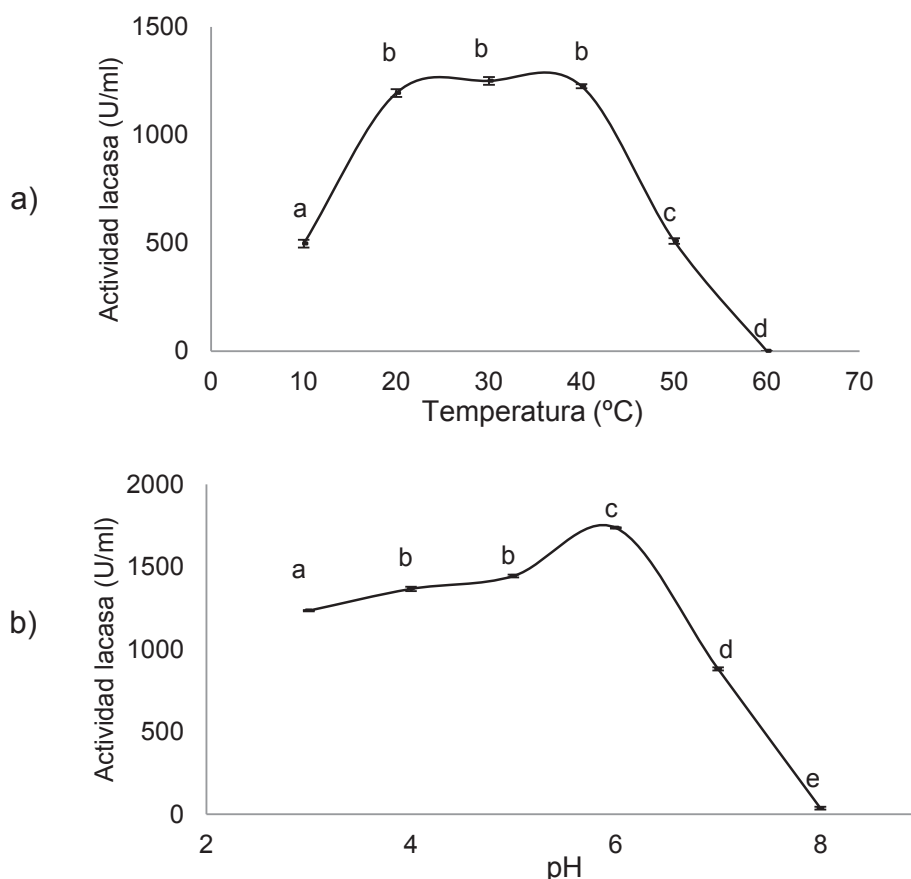


Figura 9. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lacasa de *A. fuscosuccinea* ECS-0210. a) Temperatura (10-60°C), b) pH (3.0-8.0) con la siringaldazina como sustrato. Media de dos repeticiones y desviación estándar.

En el caso del pH, ambos extracto obtuvieron valores máximo de actividad (1,736, 8,464 U/ml, para actividad lacasa y fenol oxidasa, respectivamente) en un valor de pH 6.0. La actividad lacasa se pierde rápidamente en valores de pH arriba de 8.0, en tanto, la actividad fenol oxidasa aún está presente con valores de 4115 U/ml. Esto representa 59% de su valor óptimo.

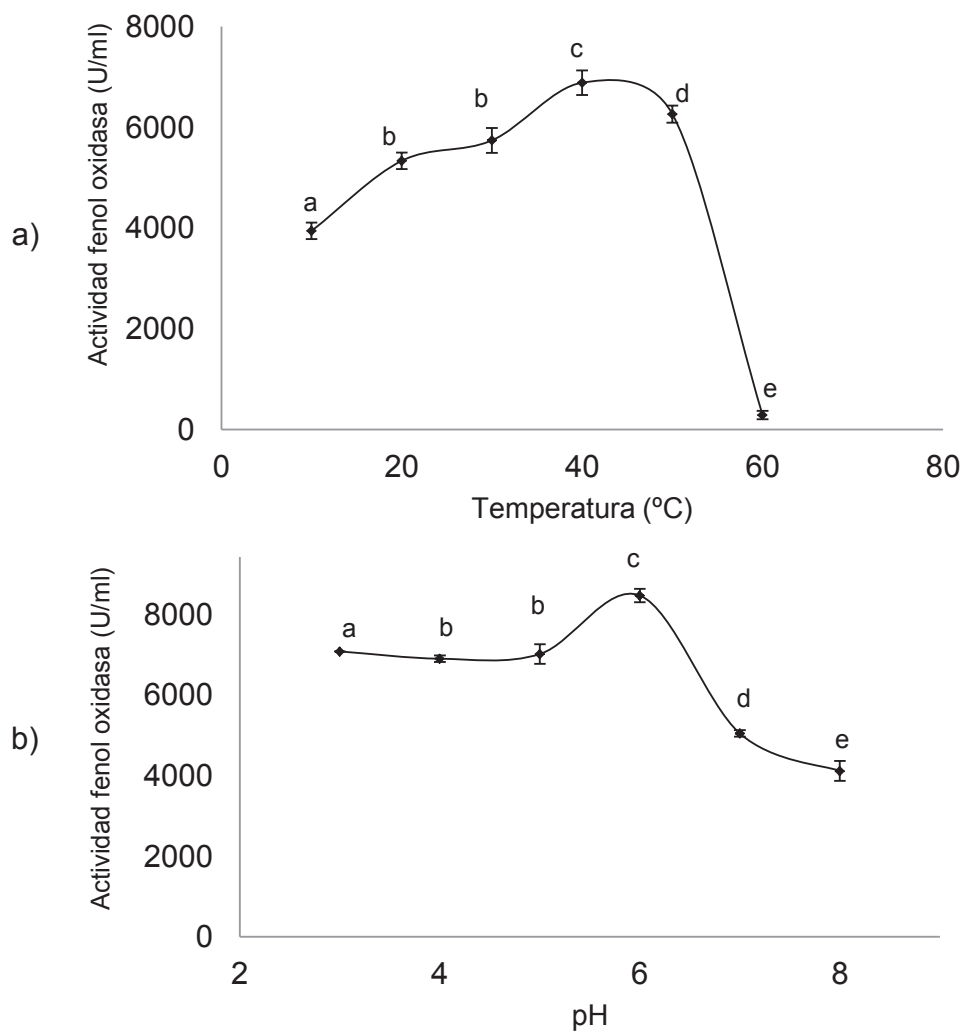


Figura 10. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad fenol oxidasa de *A. fuscosuccinea* ECS-0210 a) Temperatura (10–60°C), b) pH (3.0–8.0), después de 15 min de incubación. Sustrato catecol. Media de dos repeticiones y desviación estándar.

### **5.7. Degradación de endosulfán por las fracciones de alta pureza enzimática.**

Los resultados obtenidos en este ensayo revelaron que las enzimas ligninolíticas aisladas no fueron capaces de transformar el insecticida, bajo las condiciones probadas. Las mezclas de reacción evaluadas en todos los casos no superaron el 5% de degradación. El ANOVA utilizado para este ensayo demostró que no hubo diferencias significativas en cada uno de los tratamientos ( $P > 0.05$ ).



## 6. DISCUSIÓN GENERAL

Los plaguicidas organoclorados (POC) son considerados contaminantes orgánicos persistentes, la mayoría de los POC se encuentran prohibidos tanto en su fabricación como en su aplicación a nivel mundial. Sorpresivamente el endosulfán aún se emplea en diferentes países, a pesar de los daños ambientales y de salud asociados a este producto. Diferentes grupos de investigación han estudiado la utilización de organismos capaces de degradar endosulfán, con la finalidad de desarrollar procesos de biorremediación (Goswami *et al.*, 2009). Entre los organismos utilizados, resaltan los HPB (Mtui, 2012), sin embargo, a pesar de la información existente, falta conocimiento para esclarecer las vías o mecanismos de oxidación enzimática utilizada por los hongos ligninolíticos para la transformación de los contaminantes ambientales (Kamei *et al.*, 2011).

La primera fase de este trabajo consistió en seleccionar una cepa del hongo *A. fuscosuccinea* cuyo extracto enzimático libre de células fuera capaz de degradar endosulfán. Cuatro cepas de *A. fuscosuccinea* fueron cultivadas bajo condiciones controladas. Los resultados demuestran que durante ocho días de crecimiento en medio líquido las cuatro cepas evaluadas degradan 94-100% de este insecticida. Se registraron los parámetros de crecimientos (biomasa, cambio de pH, consumo de azúcar) para las cuatro cepas de *A. fuscosuccinea*, bajo las condiciones de cultivo establecidas. Referente al pH, se registraron dos rangos donde se realizó la degradación del endosulfán. Para las cepas ECS-0201 y ECS-0210, la transformación se efectuó sin variación considerable del pH, a valores de 6.8-6.9. Esto concuerda con el estudio de Hussain y colaboradores (2007), quienes reportaron que en un pH de 6.0

se realiza la máxima degradación de endosulfán por tres hongos aislados en suelo. Una acidificación del medio líquido se asocia a la formación de ácidos (orgánicos e inorgánicos) resultantes de la oxidación de la fuente de carbono, o bien, la deshalogenación del endosulfán ocurrida en la biodegradación (Sutherland *et al.*, 2000). Por otra parte, para las cepas ECS-0202 y ECS-0217 la máxima degradación de endosulfán a los ocho días de crecimiento ocurre en un valor final de pH 8.0, estos hongos alcalinizaron el medio de cultivo que tenía un pH inicial de 6.6. La alcalinización del medio de cultivo puede deberse a la utilización de la fuente de nitrógeno, donde se involucran reacciones como la descarboxilación de aminoácidos (Koneman *et al.*, 1997). El aumento del pH durante la degradación del endosulfán, ha sido reportado también en el trabajo de Miles y Moy (1979). Comparando los resultados de este estudio con lo encontrado en la literatura, podemos asumir que el valor final del pH dependerá de factores como las condiciones de cultivo establecidas y los organismos empleados en la transformación del insecticida.

El crecimiento de las cuatro cepas de *A. fuscusuccinea* fue realizado en medio de cultivo (en ausencia y presencia de endosulfán), y se determinó la actividad de las enzimas ligninolíticas. Las respuestas de las cepas del hongo en cultivo con presencia de endosulfán mostró un aumento de la actividad enzimática (fenol oxidasa y lacasa) del cuarto al octavo día de crecimiento (tabla 4). Cuando el hongo crece en presencia de endosulfán, se notó un aumento de la actividad enzimática del día cuatro al ocho, estos resultados concuerda con el estudio de Mougín y colaboradores (2002), donde los autores reportan que la presencia de diferentes contaminantes ambientales (como: agroquímicos, compuestos industriales y solventes) ocasionan un aumento de la

actividad lacasa del hongo *Trametes versicolor*. El mejoramiento de la actividad puede deberse a que los compuestos actúan como inductores, estimulando así la producción enzimática.

La evaluación de cinco enzimas ligninolíticas (aril-alcohol oxidasa, fenol oxidasa, lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) demostró que sólo los sobrenadantes libres de células de las cepas ECS-0201 y ECS-0210 presentaron actividad de enzimas oxidasas: fenol oxidasa y lacasa. Las enzimas ligninolíticas peroxidadas evaluadas no fueron detectadas en ninguna de las cuatro cepas. Diversos trabajos de investigación asocian la baja actividad o la ausencia de actividad de este tipo de enzimas ligninolíticas a las condiciones de crecimiento o la composición del medio de cultivo utilizado para la secreción de las enzimas en el medio extracelular (Saparrat *et al.*, 2002; Zucca *et al.*, 2011).

La composición de las enzimas constituyentes del sistema ligninolítico depende de cada especie, en la naturaleza, algunos hongos de pudrición degradan selectivamente la lignina, y por tanto estas especies carecen de una o más enzimas ligninolíticas (Erikson *et al.*, 1990). A nivel de laboratorio, se ha descrito que durante los procesos de producción: la síntesis y secreción de las enzimas ligninolíticas al medio extracelular ocurre en condiciones de niveles limitado de carbono o nitrógeno, además se ha descrito que la producción de enzimas ligninolíticas, es generalmente óptima en presencia de altas cantidades de oxígeno, pero es reprimida por la agitación en cultivo líquido sumergido (Hou *et al.*, 2004; Elisashvili *et al.*, 2008). Por su parte, la producción de lacasa del hongo *Trametes pubescens* MB 89 se inicia cuando la glucosa (fuente de carbono) se agota en el medio de crecimiento (Galhaup *et al.*, 2002). Dado lo anterior,

la implementación de un proceso óptimo de producción enzimática dependerá de las características del organismo con el que se trabaje, para diseñar la producción con las condiciones más favorables.

Las cepas ECS-0202 y ECS-0217 no presentaron actividad enzimática ligninolítica detectada mediante las técnicas espectrofotométricas, pero disminuyeron la concentración de endosulfán. Esta situación deberá ser esclarecida en trabajos posteriores. Mougín y colaboradores (1996) y Jauregui y colaboradores (2003) exponen la participación de un sistema intracelular (sistema citocromo P-450) vinculado a la degradación de contaminantes. Esta alternativa podría explicar el posible mecanismo utilizado por ambas cepas de hongos que no presentaron actividad ligninolítica bajo las condiciones de cultivo empleadas en el ensayo.

Aun cuando se emplean condiciones de crecimiento específicos para estimular la secreción de algunas enzimas ligninolíticas de un hongo en particular, no se garantiza la producción de estas enzimas en otras especies de hongos (Peláez *et al.*, 1995). Probablemente el medio de cultivo utilizado en este trabajo (2 g glucosa y 5 g extracto de levadura, por litro) no indujo la expresión de las enzimas peroxidasas para las cepas de *A. fuscosuccinea*. En este sentido, el hecho de no detectar todas las actividades ligninolíticas en todas las cepas, sugiere que estos hongos podrían no producir niveles significantes de las enzimas, o bien, las condiciones de crecimiento establecidas no favorecieron la secreción extracelular. Otra posibilidad de no haber detectado la actividad peroxidasa en las cepas de *A. fuscosuccinea*, es que estas cepas no produzcan dichas enzimas (Okino *et al.*, 2000)

Las cepas ECS-0201 y ECS-0210 presentaron actividad oxidasa pero no peroxidasa. Okino y colaboradores (2000), reportan algunas cepas de *A. fuscosuccinea*, aisladas en bosques de Brasil, que presentaban resultados positivos para las enzimas oxidasas y negativos para la actividad peroxidasa. Los autores señalan que la diferencia de los registros puede asociarse a la variabilidad genética de las cepas. Los resultados obtenidos insinúan que el grupo enzimático de las oxidasas (lacasa y fenol oxidasa) extracelulares de las cepas ECS-0201 y ECS-0210 pueden estar vinculados con la transformación del endosulfán. En el reporte de Kullman y Matsumura, (1996), exponen la degradación del endosulfán asociada al grupo de enzimas oxidasas del hongo *P. chrysosporium*, sin la intervención de las enzimas peroxidasa.

El último ensayo de la primera fase evaluó la capacidad del extracto enzimático libre de células de *A. fuscosuccinea* ECS-0201 y ECS-0210 para reducir el contenido de endosulfán y de esta manera vincular a las enzimas extracelulares con la desaparición del insecticida. La preparación libre de células de la cepa ECS-0210 obtuvo los mayores porcentajes de disminución: 69–97% (tabla 5). El extracto enzimático de ECS-0210 en presencia de  $MnSO_4$  y Tween 80 sin la utilización de mediadores obtuvo un porcentaje de degradación similar a las mezclas de reacción con mediadores. Pizzul y colaboradores (2009) reportan hasta 63% de degradación del herbicida glifosato en una mezcla de reacción en presencia de  $MnSO_4$  y Tween 80. En los ensayos para la degradación de diversos contaminantes la presencia del Tween 80 mejoró la solubilidad de estos en las mezclas de reacción, beneficiando su disponibilidad para reaccionar con las enzimas. Tal es el caso, del estudio sobre *P. chrysosporium* y la degradación de fenantreno, pireno y benzo[a]pireno, el cual demostró que el Tween 80 contribuía en la

biodisponibilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), para reaccionar con el sistema enzimático ligninolítico del hongo (Zheng y Obbard, 2002).

El extracto libre de célula del hongo *A. fuscosuccinea* ECS-0210 transformó el contaminante pero no se detectó la presencia de sulfato endosulfán en la mezcla de reacción. Katayama y Matsumura (1993) reportan la presencia del endosulfán-diol, como el principal metabolito generado durante el ensayo de degradación del insecticida en cultivos estáticos del hongo *Trichoderma harzianum*. Los autores sugieren que la degradación esta mediada por una enzima hidrolítica, una sulfatasa, la cual puede ser responsable de la formación indirecta del endosulfán-diol por la hidrólisis del sulfato endosulfán. En los presentes ensayos sólo trató de determinarse el contenido del sulfato endosulfán debido a la actividad oxidativa de enzimas ligninolíticas, por ello, se sugiere en estudios futuros trabajar con estándares de los metabolitos por vía hidrolítica como endosulfán-diol, el endosulfán-lactona, el endosulfán-éter y relacionar los productos a los posibles mecanismos de degradación que ocurren en la mezcla de reacción.

Dentro de los objetivos del presente trabajo se planteó la producción y purificación de las enzimas ligninolíticas de *A. fuscosuccinea* asociadas a la degradación del endosulfán. Para realizar el proceso de producción de una enzima es importante tener en cuenta aspectos referentes a la cepa seleccionada. Una característica de importancia es verificar que la enzima a trabajar sea extracelular, ya que, los procedimientos de aislamiento y purificación son más sencillos y menos costosos en comparación con los utilizados para obtener enzimas intracelulares (Segura-Sanchez et

*al.*, 2002). La característica anteriormente mencionada, reforzó la elección de la cepa *A. fuscosuccinea* ECS-0210, sobre las otras cepas evaluadas.

Una segunda fase del proyecto consistió en producir y purificar las enzimas que probablemente estén vinculadas en la transformación del endosulfán. La cepa seleccionada fue la ECS-0210, ya que su extracto enzimático libre de células disminuyó el contenido de endosulfán y se determinó la presencia de las enzimas ligninolíticas: fenol oxidasa y lacasa.

Se definió un proceso de producción enzimática de tres días de cultivo, realizando el protocolo de purificación establecido por Román y colaboradores (2010). La única modificación realizada en el protocolo fue una doble precipitación con sulfato de amonio (50 y 80%) de las proteínas del extracto libre de células de las cepas. Esta medida fue necesaria para garantizar la presencia de ambas enzimas en el extracto dializado. El hecho de emplear dos fraccionamientos con el sulfato de amonio permite deshacerse de una gran cantidad de proteínas extracelulares que pueden ser consideradas como contaminantes. Los reportes sobre la purificación de enzimas ligninolíticas en hongos de pudrición blanca, varían en la utilización de técnicas cromatográficas. La disminución de los pasos de purificación enzimática es beneficiosa en el aspecto tiempo-economía cuando se considera realizar estos procesos a nivel industrial (Román *et al.*, 2010; Cabrera-Soto, 2011).

Después de obtener el extracto dializado se emplearon dos cromatografías de intercambio iónico. El empleo de las columnas de intercambio aniónico de afinidad débil (DEAE) y afinidad fuerte (High Q) permitió obtener fracciones de alta pureza con

actividad fenol oxidasa y lacasa (figura 5 y 6). La detección de las proteínas presentes se hizo de manera cualitativa mediante absorción a 280 nm, esta medición se basa en la absorción que presentan los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina constituyentes de las proteínas presentes en la solución (Cabrera-Soto, 2011). Las proteínas finalizaron el protocolo de purificación con una actividad específica de 388 U/mg y 88.5 U/mg para lacasa y fenol oxidasa, respectivamente (tabla 7 y 8). En ocasiones, el proceso de purificación seleccionado puede ocasionar la disminución de la actividad específica al finalizar el protocolo de purificación (Cabrera-Soto, 2011). Lo habitual es que en cada paso de purificación, la actividad específica vaya aumentando como consecuencia de la purificación enzimática, de esta manera ocurrió en nuestro estudio y coincide con lo reportado por diversos autores (Sadhasivam *et al.*, 2008; Manavalan *et al.*, 2013).

El protocolo de purificación establecido en este trabajo permitió purificar la enzima fenol oxidasa con un peso molecular de 100 kDa, la cual se refleja por la aparición de una sola banda en el gel de poliacrilamida (figura 7). Sánchez-Rosario y colaboradores (2011), así como Ögel y colaboradores (2006) reportan enzimas fenol oxidasas con peso molecular de 87 y 83 kDa, respectivamente. No se logró obtener un extracto de alta pureza para la enzima lacasa de la cepa *A. fuscosuccinea* ECS-0210. En el zimograma con la enzima nativa del extracto con actividad lacasa (figura 8), se aprecia la mancha amarilla debido a la oxidación del DMP, en la banda de menor porcentaje en el PAGE. Las bandas que aparecen en mayor proporción no tienen actividad lacasa, lo cual sugiere que sean enzimas que tengan características fisicoquímicas similares y además, un peso molecular cercano a la lacasa de la cepa ECS-0210, y por tanto, no



se pudo realizar la separación adecuada mediante las técnicas cromatográficas. El éxito de un proceso de purificación muchas veces dependerá de la respuesta del hongo a las condiciones de cultivo establecidas para lograr la secreción de la enzima ligninolítica, así como las técnicas empleadas para el protocolo de purificación. Debido a lo anterior, diversos estudios emplean mediadores para favorecer la producción de la enzima de interés, así como un número mayor de pasos en el protocolo de purificación para lograr una enzima ligninolítica de alta pureza (Nagai *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2013).

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos con actividad fenol oxidasa y lacasa, se evaluó su estabilidad referente a temperatura y pH. El extracto con actividad lacasa tiene un rango óptimo de temperatura de 20–40°C y un pH con valor a 6.0. Diversos reportes indican rangos de valores óptimos para temperatura de 40–60°C y de pH de 2.2 a 7.0 (Sadhasivam *et al.*, 2008; Manavalan *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). El extracto con actividad fenol oxidasa obtuvo valores óptimos de 40°C y pH 6.0. Otros autores reportan la enzima fenol oxidasa aislada de hongos, con valores óptimos de pH en un rango de 6.0–7.5 y de temperatura 55–65°C (Kolcuoğlu, 2012; Ögel *et al.*, 2006; Sánchez-Rosario *et al.*, 2011).

El último ensayo cuantificó la degradación de endosulfán por las fracciones purificadas con actividad fenol oxidasa y lacasa. Ambos extractos enzimáticos no presentaron porcentajes de degradación mayores a 5%, bajo las condiciones de reacción establecidas. Los mediadores utilizados en el ensayo (1-HBT y siringaldazina) no mejoraron la eficiencia de la actividad enzimática sobre la degradación, como lo han reportado en otros estudios en degradación de diferentes contaminantes ambientales (Murugesan *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2011). Guthrie (2007), estudió la transformación

del pentaclorofenol por cultivos en crecimiento del hongo *Trametes* sp. El autor purificó la enzima lacasa para evaluar su eficiencia en la degradación y encontró que el mejor rendimiento ocurre cuando se agrega un mediador (ABTS) en la mezcla de reacción.

Los resultados de la degradación de endosulfán mediante las fracciones purificadas con actividad fenol oxidasa y lacasa sugiere que estas no son las responsables de la oxidación del endosulfán. Lo anterior, se refuerza por los resultados en los ensayos anteriores sobre la de degradación con el hongo en crecimiento (sección 5.1) y el ensayo de degradación mediante el extracto libre de células de la cepa ECS-0210 (sección 5.2), en los cuales no se encontró el metabolito sulfato endosulfán, compuesto resultante de la degradación oxidativa (realizada por enzimas ligninolíticas) del endosulfán. De igual manera, podría suceder un proceso sinérgico, es decir, la degradación de endosulfán ocurre en presencia de ambas enzimas (Guillén *et al.* 2000), sin embargo, este ensayo no pudo ser evaluado en este estudio y es poco probable que sea así sea, por los resultados de los ensayos señalados anteriormente.

Es importante apuntar que los extractos libres de células fueron capaces de transformar al plaguicida, lo que indica la presencia de al menos una enzima o grupo enzimático distinto a las enzimas ligninolíticas responsables de la disminución del contenido de endosulfán en las mezcla de reacción.

## 7. CONCLUSIONES

Las cuatro cepas de *A. fuscosuccinea* ECS-0201, ECS-0202, ECS-0210 y ECS-0217 disminuyeron el contenido de endosulfán durante su crecimiento en medio líquido. Sólo los hongos ECS-0201 y ECS-0210 presentaron actividad de las enzimas fenol oxidasa y lacasa.

De las cepas *A. fuscosuccinea* ECS-0201 y ECS-0210, el extracto enzimático libre de células de la cepa ECS-0210 disminuyó en mayor cantidad contenido de endosulfán bajo condiciones controladas.

Se obtuvo un extracto de alta pureza con actividad fenol oxidasa de un peso molecular de 100 kDa, con valores de estabilidad de temperatura de 40°C y pH de 6.0. El extracto con actividad lacasa que no se encuentra totalmente purificado, obtuvo valores óptimos de actividad en un rango de temperatura de 20–40°C y un pH de 6.0.

Las fracciones de alta pureza con actividad fenol oxidasa y lacasa no disminuyeron el endosulfán cuando se evaluaron de manera individual, bajo condiciones controladas. Algunos factores como el tiempo de la reacción, la utilización de mediadores, ensayos de sinergismo pudieron influir en la nula degradación del contaminante.

Los extractos de alta pureza con actividad fenol oxidasa y lacasa no están asociados directamente en la degradación del endosulfán; además, al no detectar el metabolito sulfato endosulfán en las mezclas de reacción, sugiere la intervención de una o un grupo de enzimas distintas a las oxidativas participando en la disminución del contenido de endosulfán.

Como perspectivas generadas en este trabajo de investigación se considera, primeramente, establecer un diseño experimental enfocado a la búsqueda de la enzima responsable de la degradación del endosulfán. Implementar un protocolo de purificación adecuado y evaluar su actividad en ensayos de degradación.

## 8. LITERATURA CITADA

- Alegria, H.A., Wong, F., Jantunen, L.M., Bidleman, T.F., Salvador-Figueroa, M., Gold-Bouchot, G., Moreno Ceja, V., Waliszewski, S.M. y Infanzon, R., 2008.** Organochlorine pesticides and PCBs in air of southern Mexico (2002–2004). *Atmospheric Environment*, 42 (38), pp. 8810–8818.
- Andrade-Gallegos, R.H., Chacón, S. y Sánchez-Vázquez, J.E, 1996.** Estudio sobre los hongos (Macromicetos) en tres plantaciones de café en el municipio de Tapachula, Chiapas (México). *Revista Mexicana de Micología*, 12: 79–88.
- Beauvais, S.L., Silva, M.H. y Powell, S., 2010.** Human health risk assessment of endosulfan. Part IV: Occupational reentry and public non-dietary exposure and risk. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (1), pp. 38–50.
- Bezalel, L., Hadar, Y. y Cerniglia, C., 1997.** Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7), pp. 2495–2501.
- Cabrera-Soto, M.L., 2011.** Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, pp. 135.
- Calo, M. y Wise, T.A., 2005.** Revaluating peasant coffee production: Organic and fair trade markets in Mexico. [pdf] USA: Global Development and Environment Institute.] Disponible: <http://ase.tufts.edu/gdae/pubs/rp/RevaluatingCoffee05.pdf>> Accedido 10 de Noviembre 2012.

- Castillo, J.M., Casas, J. y Romero, E., 2011.** Isolation of an endosulfan-degrading bacterium from a coffee farm soil: Persistence and inhibitory effect on its biological functions. *Science of the Total Environment*, 412-413, pp. 20–27.
- D’Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quarantino, D., Mincione, E. y Petruccioli, M., 2005.** Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (6), pp. 723–731.
- Damon, A., 2000.** A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research*, 90 (6), pp. 453–465.
- Desalegn, B., Takasuga, T., Harada, K.H., Hitomi, T., Fujii, Y., Yang, H.R., Wang, P., Senevirathna, S. y Koizum, A., 2011.** Historical trends in human dietary intakes of endosulfan and toxaphene in China, Korea and Japan. *Chemosphere*, 83 (10), pp. 1398–1405.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E. y Penninckx, M., 2008.** Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (11), pp. 1531–1538.
- Erikson, K.E.L., Blanchette, R.A. y Ander, P., 1990.** Microbial and enzymatic degradation of wood components. *Springer Series in Wood Science*, pp. 407.
- Escobar, V., Nieto, M., Sánchez, J. y Cruz, L., 2002.** Effect of endosulfan on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* and *Auricularia fuscusuccinea* in liquid culture. In:

Proceed. IV International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Cuernavaca, Mexico, pp. 399–408.

**Fernández-Moreno, J.L., Garrido-Frenich, A., Plaza-Bolaños, P. y Martínez-Vidal, J.L., 2008.** Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticides residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 43 (9), pp. 1235-1254.

**Galhaup C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. y Haltrich, D., 2002.** Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30 (4), pp. 529–536.

**Goswami, S., Vig, K. y Singh, D.K., 2009.** Biodegradation of  $\alpha$  and  $\beta$  endosulfán by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere*, 75 (7), pp. 883–888.

**Grassi, E., Scodeller, P., Filiel, N., Carballo, R. y Levin, L., 2011.** Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65 (4), pp. 635–643.

**Guillén, F., Gómez-Toribio, V, Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2000.** Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383 (1), pp. 142–147.

**Guthrie, J.M., 2007.** Degradation of PCP by laccases of the white-rot fungus *Trametes sp.* HR577. Tesis de Doctorado, Massey University, pp. 253.

- Hernández-Romero, H., Tovilla-Hernández, C., Malo, E.A y Bello-Mendoza, R., 2004.** Water quality and presence of pesticides in a tropical coastal wetland in southern Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 48 (11-12), pp. 1130–1141.
- Hernández-Rodríguez, D., Sánchez, J.E., Nieto, M.G. y Márquez-Rocha, F.J., 2006.** Degradation of endosulfan during substrate preparation and cultivation of *Pleurotus pulmonarius*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (7), pp. 753–760.
- Hou, H., Zhou, j., Wang, J., Du, C. y Yan, B., 2004.** Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39 (11), pp. 1415–1419.
- Hussain, S., Arshad, M., Saleem, M. y Zahir, Z.A., 2007.** Screening of soil fungi for in vitro degradation of endosulfan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (7), pp. 939–945.
- Jauregui, J., Valderrama, B., Albores, A. y Vazquez-Duhalt, R., 2003.** Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation* 14 (6), pp. 397-406.
- Kamei, I., Takagi, K. y Kondo, R., 2011.** Degradation of endosulfan and endosulfan sulfate by white-rot fungus *Trametes hirsuta*. *Journal of Wood Science*, 57 (4), pp. 317–322.



- Katayama, A. y Matsumura, F., 1993.** Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12 (6), pp. 1059–1065.
- Kolcuoğlu, Y., 2012.** Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentata*). *Process Biochemistry*, 47 (12), pp. 2449–2454.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W. y Dowell, R., (1997).** Diagnostico Microbiológico: "Pruebas Bioquímicas". Texto y atlas a color. (Meerif N. y Roel, B. Trads). Trabajo original publicado en 1988. 5ta. edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina, pp. 186.
- Kullman, W. y Matsumura, F., 1996.** Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2), pp. 593-600.
- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), pp. 680–685.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R. y Bononi, V.L.R., 2005.** Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36 (3), pp. 246–252.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K.P. y Heese, K., 2013.** Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 70: 106–114.

- Manole, A., Herea, D., Chiriac, H. y Melnig, V., 2008.** Laccase activity determination. In: *Analele Scientifiche Ale Universitat Al. I. Cuza. Tomul IV, Iasi*, pp. 17–24.
- Miles, J.R.W. y Moy, P., 1979.** Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 23 (1), pp. 13–16.
- Mnif, W., Hassine, A.I., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O. y Roig, B., 2011.** Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8 (6), pp. 2265–2303.
- Mougin, C., Pericaud, C., Malosse, C., Laugero, C. y Asther, M., 1996.** Biotransformation of the insecticide Lindane by white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide Science*, 47 (1), pp. 51–59.
- Mougin, C., Kollmann, A. y Jolival, C. 2002.** Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*, 24: 139–142.
- Mtui, G.Y.S., 2012.** Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and Essays*, 7 (5), pp. 1544–1555.
- Muñoz, G., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 1997.** Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and  $Mn^{2+}$  oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6), pp. 2166–2174.

- Murugesan, K., Arulmani, M., Nam, I.H., Kim, Y.M., Chang, Y.S. y Kalaichelvan, P.T., 2006.** Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(5), pp. 939–46.
- Nagai, M., Sakamoto, Y., Nakade, K. y Sato, T., 2009.** Purification of a novel extracellular laccase from solid-state culture of the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Mycoscience*, 50 (4), pp. 308–312.
- Nieto-Lopez, C. y Sánchez-Vázquez, J.E., 1997.** Mycelial growth of *Pleurotus* and *Auricularia* in agroindustrial effluents. *Micología Neotropical Aplicada*, 10, pp. 47–56.
- Ögel, Z.B., Yüzügüllü, Y., Mete, S., Bakir, U., Kaptan, Y., Sutay, D. y Demir, A.S., 2006.** Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71 (6), pp. 853–862.
- Okino, L.K., Machado, K.M.G., Fabris, C. y Bononi, V.L.R., 2000.** Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (8-9), pp. 889–893.
- Paszczyński, A., Crawford, R.L. y Huynh, V.N., 1988.** Manganese, peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods in Enzymology* 161, 264–270.

- Peláez, F., Martínez, M.J. y Martínez A.T., 1995.** Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*, 99 (1), pp. 37–42.
- Pizzul, L., Castillo, M.P. y Stenström, J., 2009.** Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*, 20 (6), pp. 751–759.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Ximenes, V.F., de Andrade R.M.B., Talamoni, J.L.B., Libanio, M., de Almeida, M.V., Apon, B.M. y Cavalari, A.A., 2006.** Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of Sao Paulo State, Brazil. *Chemosphere*, 65 (11), pp.1949–58.
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2004.** Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*, 36 (6), pp. 909–916.
- Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M. y Vázquez-Duhalt, R., 2010.** Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica*. *Revista Mexicana de Micología*, 32, pp. 19–27.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. y Lin, F.H., 2008.** Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL. *Process Biochemistry*, 43 (7), pp. 736–742.

- Sánchez-Rosario, Y., Sánchez, J.E., Vázquez-Duhalt, R. y Andrade-Gallegos, R.H., 2011.** Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*. *Revista Mexicana de Micología*, 34, pp. 31–42.
- Saparrat, M.C.N., Martinez, M.J., Cabello, M.N. y Arambarri, A.M., 2002.** Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19, pp. 181–185.
- Segura-Sanchez, F., Mendoza, N.E. y Mejía, A.I., 2002.** Ensayo de diferentes tipos de biorreactores para escalar la producción de la enzima ligninoperoxidasa en cultivos sumergidos de *Phanerochaete chrysosporium*. *Vitae*, 9 (2), pp. 17–26.
- Shi, Y., Lu, Y., Wang, T., Wang, G. y Luo, W., 2009.** Comparison of organochlorine pesticides occurrence, origin, and character in agricultural and industrial soils in Beijing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57 (3), pp. 447–455.
- Shivaramaiah, H.M. y Kennedy, I.R., 2006.** Biodegradation of endosulfan by a soil bacterium. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41(5), pp. 895–905.
- Siddique, T., Okeke, B.C., Arshad, M. y Frankenberguer, W.T., 2003.** Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganism. *Journal of Environmental Quality* 32, 47–54.

- Silva, M.H. y Carr Jr., W.C., 2010.** Human health risk assessment of endosulfan: II. Dietary exposure assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (1), pp. 18–27.
- Silva, M.H. y Beauvais, S.L., 2010.** Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (1), pp. 4–17.
- Sutherland, T.D., Horne, I., Lacey, M.J., Harcourt, R.L., Russel, R.J. y Oakeshott, J.G., 2000.** Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7), pp. 2822–2828.
- Tien, M. y Kirk, T.K., 1983.** Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81 (8), pp. 2280–2284.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H., 1992.** Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (33), pp. 23688–23695.
- Weber, J., Halsall, C.J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K., Hermanson, M., Hung, H. y Bidleman, T., 2010.** Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment*, 408 (15), pp. 2966–298.

- Williams, S., 1984.** Official methods of analysis of the american organization of analytical chemists, Arlington VA:A.O.A.C. p 252 ISBN 911910-27-1
- Wong, F., Alegria, H.A., Jantunen, L.M., Bidleman, T.F., Salvador-Figueroa, M., Gold-Bouchot, G., Ceja-Moreno, V., Waliszewski, S.M. y Infanzon, R., 2008.** Organochlorine pesticides in soils and air of southern Mexico: chemical profiles and potential for soil emissions. *Atmospheric Environment*, 42 (33), pp. 7737–7745.
- Wong, F., Alegria, H.A. y Bidleman, T.F., 2010.** Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil–air exchange. *Environmental Pollution*, 158 (3), pp. 749–755.
- Zhang, J.L. y Qiao, C.L., 2002.** Novel approaches for remediation of pesticide pollutants. *International Journal of Environment and Pollution*, 18 (5), pp. 423–433.
- Zheng, Z. y Obbard, J.P., 2002.** Removal of surfactant solubilized polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. *Journal of Biotechnology*, 96 (3), pp, 241–249.
- Zhu, M.J., Du, F., Zhan, G.Q., Wang, H.X. y Ng, T.B., 2013.** Purification a laccase exhibiting dye decolorizing ability from an edible mushroom *Russula virescens*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 82, pp. 33–39.
- Zucca, P., Rescigno, A., Olianias, A., Maccioni, S., Sollai, F.A. y Sanjus, E., 2011.** Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus*

*sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68 (2), pp, 216–222.



## 9. ANEXO

### **Anexo1. Técnica para la extracción de Endosulfán residual (Williams, 1984)**

Reactivos: Acetonitrilo, éter de petróleo, cloruro de sodio (NaCl), sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), agua destilada.

#### **Método:**

- 1.- Tomar 3 ml del sobrenadante y depositar en un embudo de separación.
- 2.- Adicionar 6ml de acetonitrilo, agitar 2 minutos.
- 3.- Adicionar 3 ml de éter de petróleo, agitar 2 minutos.
- 4.- Adicionar 0.3 ml de solución saturada de NaCl y 18 ml de agua destilada. Agitar dos min y dejar reposar para separar las capas.
- 5.- Desechar la capa acuosa y lavar la capa del solvente con porciones de 3 ml de agua destilada. Repetir tres veces el lavado.
- 6.- Descartar la capa acuosa y recuperar la capa con el solvente en un tubo de ensayo (que contiene 0.5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) de lavar el embudo de separación con 1 ml de éter de petróleo y adicionarlo al tubo con la fase etérea. Agitar vigorosamente.
- 7.- Retirar la fase orgánica y guardar en un vial con tapa sellada en un refrigerador hasta su cuantificación.

**Anexo 2. Manuscrito individual sometido para su publicación en la revista Mycoscience**

**Artículo**

Ms. Ref. No.: **MYC-D-14-00076**

Title: **Purification and characterization of a phenol oxidase from the edible mushroom *Auricularia fuscusuccinea***

Revista: **Mycoscience**

**Short communication**

**Purification and characterization of a phenol oxidase from the edible mushroom**

*Auricularia fuscosuccinea*

**Alfredo Yanez-Montalvo<sup>a</sup>**, Rafael Vazquez-Duhalt<sup>b</sup>, Leopoldo Cruz-López<sup>a</sup>, Maria Calixto-Romo<sup>a</sup>, José Sánchez-Vázquez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> El Colegio de la Frontera Sur, Carretera antiguo aeropuerto km 2.5, Tapachula CP. 30700, Chiapas, México.

<sup>b</sup> Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Ensenada CP. 22800, Baja California, México.

Corresponding author:

José Ernesto Sánchez Vázquez

Tel: (962) 628-98-00 Ext. 5460

Fax: (52) 962 628 9806

E-mail: [esanchez@ecosur.mx](mailto:esanchez@ecosur.mx)

Text: 17 pages; tables: 2; figures: 3

## Abstract

A phenol oxidase from *Auricularia fuscusuccinea* was purified and characterized. The purified enzyme showed a molecular mass of 100 kDa, a  $k_{\text{cat}}$  value of  $2100 \text{ min}^{-1}$  and  $K_M$  of 407 mM when catechol is used as substrate. The enzyme showed a maximal activity of pH and temperature at 6.0 and to  $40^\circ\text{C}$ , respectively. The presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions improved two-fold the phenol oxidase activity. Inhibitors such as  $\text{Hg}^{2+}$ , sodium sulphite, ascorbic acid and hydrazine, strongly affected the enzyme activity. This is the first report on the biochemical characterization a phenol oxidase produced by the fungus *A. fuscusuccinea*.

*Keywords:* Bioremediation Cu, Enzymes, Pollutants, White-rot fungi.

Phenol oxidases are widely distributed among different organisms such as animals, plants, bacteria and fungi. White rot fungi are known as the most efficient organisms for lignin degradation. These fungi produce two major groups of ligninolytic extracellular enzymes; polyphenol oxidases and peroxidases (Mtui 2012). Phenol oxidases (PO's) comprise a dinuclear copper center and some members of this family are: catechol oxidases, laccases, tyrosinases and cresolases. Phenol oxidases are involved in the oxidation of aromatic molecules to form unstable compounds (*o*-quinones), with the reduction of molecular oxygen to form water (Mayer 1987). They are involved in different physiological activities such as the melanin synthesis, lignin degradation and the detoxification of phenolic molecules. In addition, PO's are relatively nonspecific and able to transform a variety of lignin-like aromatic molecules (Davis and Burns 1990; Wong 2009).

Phenols and aromatic amines, derived from various industrial activities such as pulp delignification, coal conversion, petrochemicals and textile dye bleaching, are considered as high impact pollutants (Zucca et al. 2011). The use of immobilized fungal PO for the treatment of phenol-containing polluted effluents has been proposed (Durán and Esposito 2000; Pointing 2001).

*Auricularia* is a genus of edible mushrooms that belongs to the family of white rot fungi and is well known for its nutritional value. Recently, antioxidant and immunomodulatory effects of proteins and polysaccharides produced from species of this genus have been reported (Kyakulaga et al. 2013). Particularly, *Auricularia* spp. has been described as potential degrader of diverse environmental pollutants (Escobar et al. 2002; Liers et al. 2010). Information about the extracellular enzymes produced by the genus *Auricularia* is scarce, and only few studies refer to the production and purification of their extracellular oxidative enzymes (Zou et al. 2014). Thus,

the aim of this work was purify and characterize a phenol oxidase isolated from liquid cultures of *A. fuscosuccinea*, in order to evaluate its potential use in the remediation of toxic effluents.

The strain *A. fuscosuccinea* ECS-0210 from the mycological collection of El Colegio de la Frontera Sur was grown at 26–28°C in a 30 mL medium containing 0.2% glucose and 0.5% yeast extract. After 7-days inoculum growth, the mycelium was homogenized in a mixer and used to inoculate 1 L of liquid medium (pH 6.6) in 4 L flask. Phenol oxidase activity in the fungus *A. fuscosuccinea* ECS-210 was monitored during seven days (Fig. 1). Enzyme activity reached a maximum after 4 days, while the protein concentration gradually increased with a maximum at day 3 and then decreased until day seven. Thus, after four days fermentation, the culture was centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 10 min. The supernatant was separated and stored at -20°C for 24 h in order to precipitate polysaccharides. The supernatant was filtered twice through Whatman paper No.1 (Whatman, Maidstone, Kent, UK) and then through a syringe filter unit Millipore with 1.2 µm pore size. Proteins were then precipitated with ammonium sulfate in two steps at 4°C. A first ammonium sulfate precipitation at 50% saturation, discharging a pellet and a second precipitation at 80% saturation. The pellet from this last precipitation was resuspended in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) and dialyzed (14 kDa cut off membrane, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) in the same buffer. After the second precipitation, the 39.7% of the PO activity was recovered with a 1.5-fold purification factor (Table 1). Two anion-exchange chromatographies were performed; first using a Macro-Prep DEAE-cellulose column (30 × 2 cm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) followed by a high affinity resin column (Macro-Prep High Q; 10 × 2 cm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Both columns were eluted applying a linear gradient of 0.0–1.0 M NaCl at a flow-rate of 2 mL/min, and 2.5 mL fractions were collected. The fractions revealing phenol oxidase activity were pooled and concentrated by ultrafiltration (Amicon,

Beverly, MA, USA) using a membrane filter with a pore size of 10 kDa (Millipore, Bedford, MA, USA). The phenol oxidase activity was measured by the oxidation of catechol to quinone ( $\epsilon_{436\text{nm}} = 3,450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Ögel et al. 2006). The reaction mixture contained 100 mM catechol dissolved in phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) and enzyme extract. One unit is defined as the amount of enzyme required for oxidizing 1  $\mu\text{mol}$  of the substrate per minute. The protein content at different steps of the purification was determined with Bio-Rad Protein Assay using bovine serum albumin (BSA) as standard. The statistical analyses: one-way ANOVA and Tukey test honestly significant difference (HSD),  $P < 0.05$ , were performed with JMP ver. 6.0 (SAS Institute 2005).

After the high-affinity column (Macro-Prep High Q) resulted in a single peak of both protein ( $A_{280}$ ) and PO activity. The purified preparation showed a specific activity of 298 U/mg, representing 78-fold purified enzymatic preparation. The purity of the enzyme was confirmed as a single band of 100 kDa in SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli 1970) (Fig. 2). The molecular weight of PO from *A. fuscossuccinea* ECS-0210 is consistent with other fungal PO reported having molecular weight ranging from 38 to 150 kDa (Levin et al. 2010). PO's produced by two strains of the fungus *Scytalidium thermophilum* showed molecular masses of 83 and 87 kDa (Ögel et al. 2006; Sánchez-Rosario et al. 2011), while plant PO's show a range of 50–380 kDa (Gao et al. 2011; Saby John et al. 2011).

The kinetics constants,  $k_{\text{cat}}$  and  $K_M$ , of the purified preparation were determined using catechol as substrate in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0). The substrate concentrations varied from 100 to 1000 mM. The purified PO from *A. fuscossuccinea* ECS-0210 showed a  $k_{\text{cat}}$  of 2100  $\text{min}^{-1}$  and an affinity constant ( $K_M$ ) of 407 mM. *A. fuscossuccinea* PO shows an affinity to

catechol close to these reported for PO from *S. thermophilum* (with a  $K_M$  value of 302.8 mM) (Sánchez-Rosario et al. 2011).

Temperature- and pH-activity profiles were determined for the purified PO preparation (Fig. 3). The maximal PO activity was found at 40°C (Fig. 3a) with a drastic activity decrease at 60°C. On the other hand, PO showed activity in a pH range of 3.0 to 8.0, with a clear optimal pH value of 6.0 (Fig. 3b). Fungal PO's are reported with optimal activities ranging from 6.0 to 7.5 and at temperatures of 55–65°C (Ögel et al. 2006; Sánchez-Rosario et al. 2011; Kolcuoğlu 2012).

The effect of several inhibitors including ascorbic acid, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), hydrazine, sodium sulphite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) and various metal salts ( $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , and  $\text{NaCl}$ ) at concentrations of 1 and 10 mM, and 10 and 25% (v/v) ethanol on the activity of the phenol oxidase was determined (Table 2). The presence of ascorbic acid, sodium sulphite or 25% ethanol resulted in a 100% activity loss, while 50% activity loss was observed in the presence of 10% ethanol. Most of the metal ions showed no significant effect on enzyme activity, except for  $\text{Hg}^{2+}$  that caused a decrease of 70% of enzymatic activity. In the opposite, and as expected for copper proteins, 10 mM  $\text{Cu}^{2+}$  enhanced the enzyme activity to 196% of the control value. The improvement of enzyme activity in the presence of different copper ions has already been documented for other fungal copper-proteins (Lorenzo et al. 2006; Forootanfar et al. 2011). Even, an innovative enzyme-ion system has been proposed for the degradation of pollutants such as 4-nitrophenol and bleaching textiles (Murugesan et al. 2006; Lu et al. 2012). Here, mercury ions and inhibitors such as ascorbic acid, sodium azide, hydrazine and sodium sulphite showed a negative effect on enzyme activity. A similar effect of those components has been reported on the activity of the laccases from *Boletus erythropus* (Özel et al. 2010) and *Fomes fomentarius* (Neifara et al. 2010).



In conclusion, this is the first report on the biochemical characterization of phenol oxidase produced by the fungus *A. fuscosuccinea*. This data could be the basis to explore its biotechnological potential for the transformation of phenolic pollutants.

## References

- Davis S, Burns RG, 1990. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32:721–726.
- Durán N, Esposito E, 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 83–89.
- Escobar VM, Nieto MG, Sánchez JE, Cruz L, 2002. Effect of endosulfan on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* and *Auricularia fuscusuccinea* in liquid culture. In Sánchez J, Huerta G, Montiel E (eds) *Mushroom Biology and Mushroom Products (Proceedings of the Fourth International Conference)*, Cuernavaca, Mexico pp 399–408.
- Forootanfar H, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Yazdi MT, 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variable*. *Bioresource Technology* 102: 1808–1814; doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.043.
- Gao ZJ, Liu JB, Xiao XG, 2011. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from leaves of *Cleome gynandra* L. *Food Chemistry* 129: 1012–1018.
- Kolcuoğlu Y, 2012. Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry* 47: 2449–2454.
- Kyakulaga AH, Ogwang PE, Obua C, Nakabonge G, Mwavu EN, 2013. Immunomodulatory effects of aqueous extracts of *Auricularia* sp. and *Pleurotus* sp. mushrooms in cyclophosphamide

immunosuppressed wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3: 662–670.

Laemmlli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Levin L, Malignani A, Ramos AM, 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology* 101: 4554–4563; doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.102.

Liers C, Bobeth C, Pecyna M, Ullrich R, Hofrichter M, 2010. DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 6:1869-1879; doi: 10.1007/s00253-009-2173-7.

Lorenzo M, Moldes D, Sanromán MA, 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63: 912–917.

Lu C, Cao L, Liu R, Lei Y, Ding G, 2012. Effect of common metal ions on the rate of degradation of 4-nitrophenol by a laccase-Cu<sup>2+</sup> synergistic system. *The Journal of Environmental Management* 113: 1–6; doi: 10.1016/j.jenvman.2012.08.023.

Mayer AM, 1987. Polyphenoloxidases in plants: recent progress. *Phytochemistry* 26: 11–20.

Mtui GYS, 2012. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: types, substrates and applications. *Scientific Research and Essays* 7: 1544–1555.

- Murugesan K, Kim YM, Jeon JR, Chang YS, 2006. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Hazardous Materials* 168: 523–529; doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.02.075.
- Neifara M, Jaouanib A, Ellouze-Ghorbela R, Ellouze-Chaabounia S, 2010. Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1–2: 68–74.
- Ögel ZB, Yüzügüllü Y, Mete S, Bakir U, Kaptan Y, Sutay D, Demir AS, 2006. Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 853–862.
- Özel A, Colak A, Arslan O, Yildirim M, 2010. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. *Food Chemistry* 119: 1044–1049.
- Pointing SB, 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20–33.
- Saby John K, Bhat SG, Prasada-Rao UJS, 2011. Isolation and partial characterization of phenol oxidases from *Mangifera indica* L. sap (latex). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 30–36.
- Sánchez-Rosario Y, Sánchez JE, Vazquez-Duhalt R, Andrade-Gallegos RH, 2011. Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*. *Revista Mexicana de Micología* 34: 31–42.

Wong DWS, 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157: 174–209.

Zou Y, Hu W, Jiang A, Ma K, 2014 Partial purification and characterization of a novel extracellular tyrosinase from *Auricularia auricula*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 1460–1469; doi: 10.1007/s12010-013-0638-8.

Zucca P, Rescigno A, Olianias A, Maccioni S, Sollai FA, Sanjus E, 2011. Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 216–222.

## Figure legends

**Fig.1** – *A. fuscossuccinea* (ECS-0210). Phenol oxidase activity (●) and protein content (gray bars) of the extracellular medium. The data represent the means of three replicate assays ± standard deviation.

**Fig. 2** – SDS-PAGE electrophoresis gel of the phenol oxidase isolated from *A. fuscossuccinea* ECS-0210. Well 1, molecular mass protein marker; Well 2, extract after (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation; Well 3, phenol oxidase fraction obtained after DEAE-cellulose chromatography; and Well 4, purified phenol oxidase after High Q chromatography.

**Fig. 3** – *A. fuscossuccinea* (ECS-0210). A: Temperature activity profile of purified phenol oxidase. Relative activity to 100% obtained at 40°C and pH 6.0 with 100 mM catechol. B: pH activity profile. A 100 mM acetate buffer was used for pH 3.0-5.0 and 100 mM phosphate for pH 6.0-8.0. Relative activity to 100% obtained at 26°C with 100 mM catechol as substrate. Data represent mean values from duplicate assays ± standard deviation. Same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test, P<0.05).

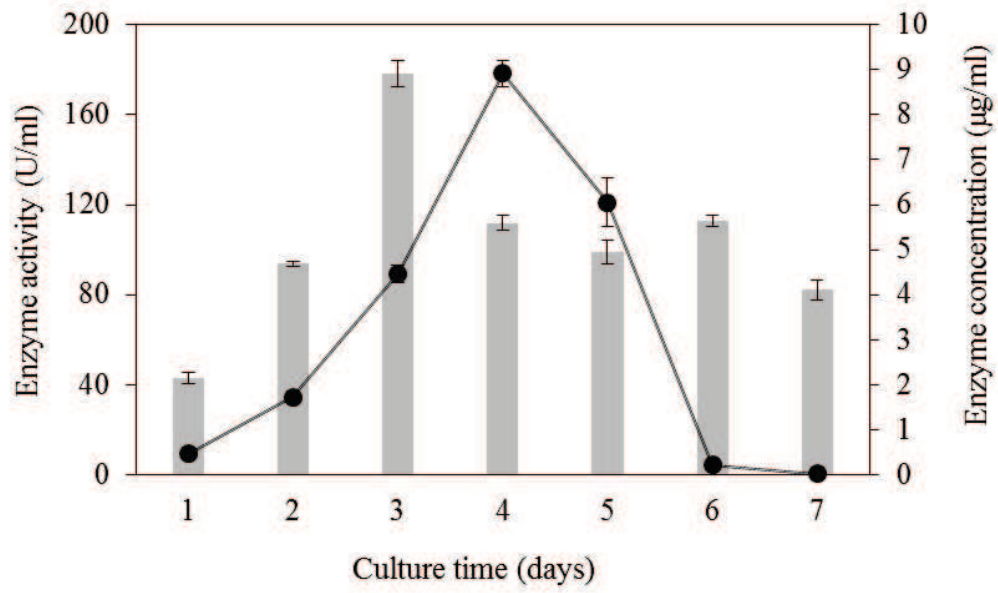


Fig. 1

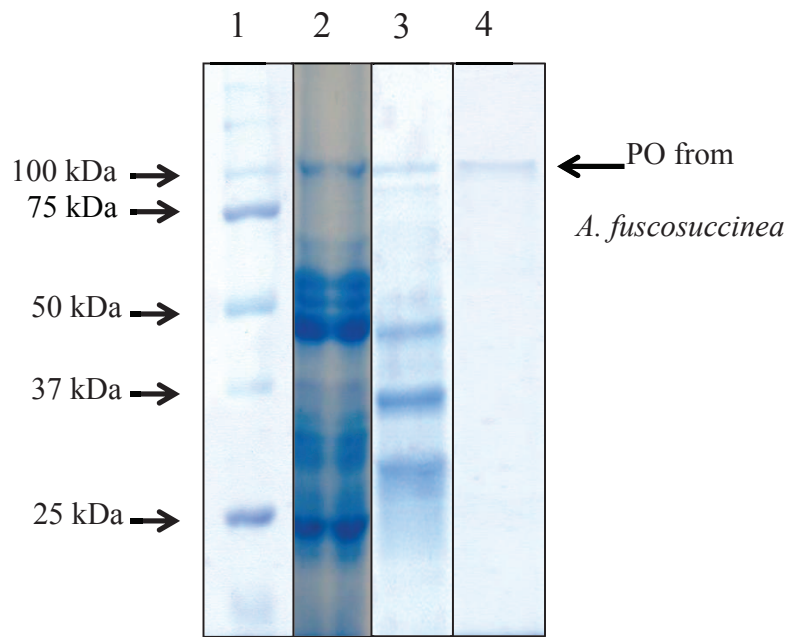


Fig. 2



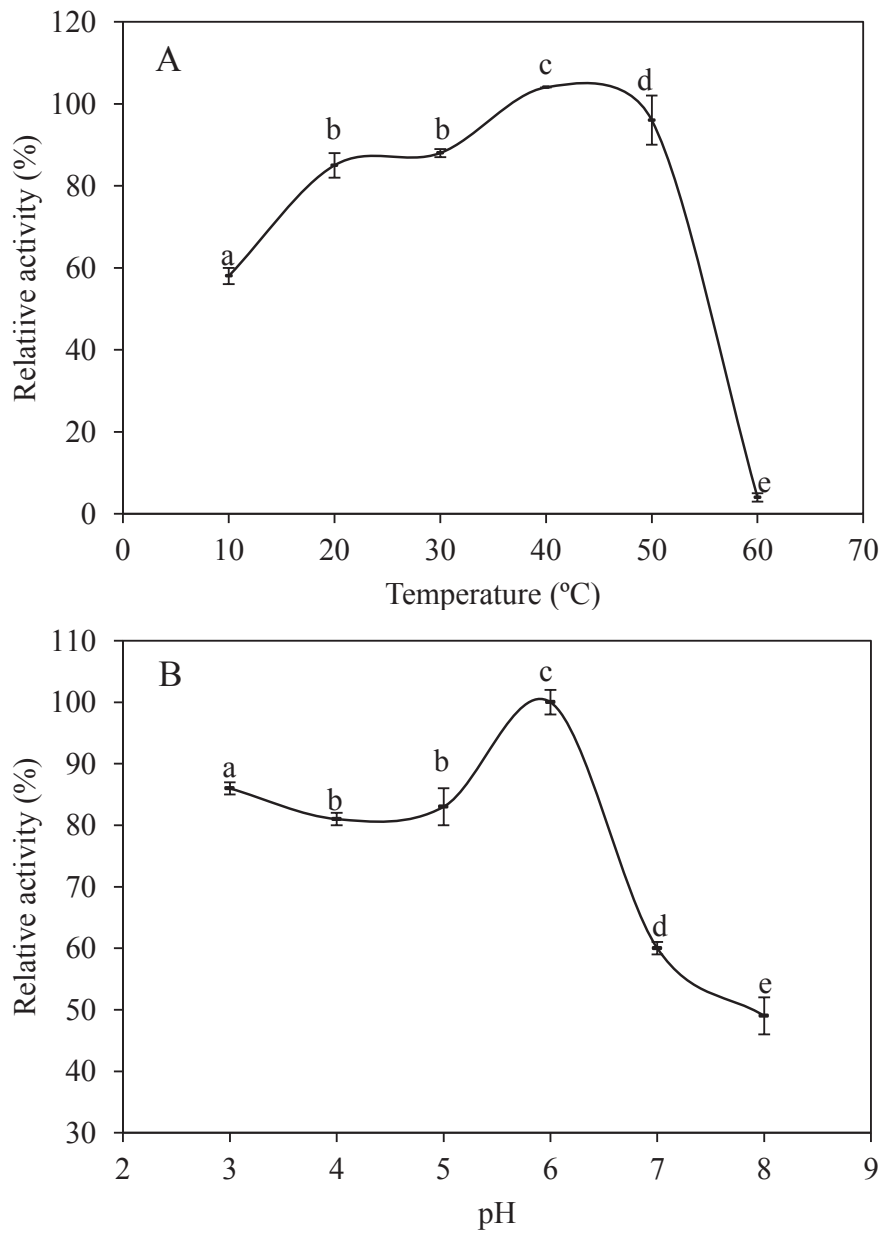


Figure 3.

**Table 1** – Activity and yield from the different steps during the purification protocol of phenol oxidase from *A. fuscusuccinea* ECS-0210.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Fermentation	169000	44	3.83	100	1
Ammonium sulphate (80%)	67060	12	5.6	39.7	1.46
DEAE–cellulose	20060	1.02	19.55	11.9	5.10
High affinity resin (High Q)	2125	0.01	298.2	1.3	77.9

**Table 2** – Effect of various compounds on the phenol oxidase activity of *A. fuscusuccinea* ECS-0210. Data represent mean values of duplicate assays  $\pm$  standard deviations. Relative activity to control activity reaction (100%) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0). Control reactions were carried out always in parallel.

Compound	Final concentration (mM)	Relative activity (%)
EDTA	1 mM	92 $\pm$ 2
	10 mM	43 $\pm$ 2
Ascorbic acid	1 mM	0
	10 mM	0
Sodium azide	1 mM	34 $\pm$ 1
	10 mM	2 $\pm$ 1
Hydrazine	1 mM	9 $\pm$ 1
	10 mM	6 $\pm$ 1
Ethanol	10%	52 $\pm$ 3
	25%	0
NaSO <sub>3</sub>	1 mM	0
	10 mM	0
NaCl	1 mM	97 $\pm$ 6
	10 mM	100 $\pm$ 1
FeSO <sub>4</sub>	1 mM	99 $\pm$ 1
	10 mM	98 $\pm$ 1
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	92 $\pm$ 1
	10 mM	97 $\pm$ 1
CuSO <sub>4</sub>	1 mM	107 $\pm$ 3
	10 mM	196 $\pm$ 3
HgSO <sub>4</sub>	1 mM	34 $\pm$ 1
	10 mM	30 $\pm$ 1

## Highlights

1. The purified enzyme showed a molecular mass of 100 kDa.
2. The enzyme showed a maximal activity of pH and temperature at 6.0 and to 40°C, respectively.
3. The presence of Cu<sup>2+</sup> ions improved two-fold the phenol oxidase activity
4. This is the first report on the biochemical characterization of phenol oxidase produced by the fungus *A. fuscusuccinea*.
5. This data could be the basis to explore its biotechnological potential for the transformation of phenolic pollutants.