

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Evaluación del potencial micorremediador de siete cepas de hongos de los géneros *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* mediante la determinación de su actividad enzimática.

Disertación previa a la obtención del título de licenciado en Microbiología

Autor: Byron David Molina Espinoza

Directora: Eva Isabel Cipriani Ávila

Quito, 2023

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del candidato Byron David Molina Espinoza ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Eva Isabel Cipriani Ávila

Directora de la Disertación

Quito, Junio 2023

DEDICATORIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tío Rene Molina, que lo considero mi segundo padre, gracias por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por siempre motivarme a salir adelante y por ayudarme alcanzar mis metas, por cada palabra de aliento y consejo para ser mejor persona. A mi padres que a pesar de la distancia me hacen sentir bien con su apoyo y amor incondicional.

Agradezco a mi directora de tesis la Mtr. Isabel Cipriani por su orientación y enseñanzas durante todo el tiempo que se realizó el estudio, toda la paciencia, compromiso y oportunidad con nosotros al realizar este proyecto.

Agradezco a mis amigos de microbiología y biología por su apoyo y amistad. Cada sonrisa y palabra de aliento para poder culminar mis estudios. A Sebastián que desde su ausencia me motivo a seguir cumpliendo mis metas. A Galo y Tomas, por cada momento que compartimos en nuestra vida universitaria

Agradezco a mis mascotas que me brindaban compañía al momento de realizar cualquier actividad académica en todo el transcurso de mi vida universitaria.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION	3
2. MATERIALES Y METODOS.....	4
2.1 Cepas fúngicas y químicos.....	4
2.2 Temperatura de crecimiento.....	5
2.3 Prueba de decoloración de tinte	5
2.4 Prueba de guaiacol	5
2.5 Prueba de ácido gálico	6
2.6 Tolerancia diésel.....	6
2.7 Determinación cuantitativa de lacasa.....	6
2.8 Control de calidad	7
2.9 Análisis estadístico	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
3.1 Temperatura de crecimiento óptima	7
3.2 Pruebas rápidas para la determinación de actividad enzimática en medio solido: ácido gálico, guaiacol y RBBR.	8
3.3 ICM 0.1%.....	11
3.4 Determinación cuantitativa de lacasa.....	11
3.5 Análisis estadístico y relación cuantitativa y cualitativa de las variables: actividad enzimática, RBBR e ICM.....	13
4. CONCLUSIONES	14
REFERENCIAS.....	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ensayo de temperatura a 30 °C de <i>Ganoderma</i> , <i>Leiotrametes</i> y <i>Rigidoporus</i>	10
Figura 2 Ensayo de temperatura a 24 °C de <i>Ganoderma</i> , <i>Leiotrametes</i> y <i>Rigidoporus</i>	10
Figura 3 Prueba guaiacol de <i>Ganoderma</i> , <i>Leiotrametes</i> y <i>Rigidoporus</i>	12
Figura 4 Cepas A y F con mejor tasa de crecimiento mm/d en RBBR.....	12
Figura 5 ICM 0.1% de <i>Ganoderma</i> , <i>Leiotrametes</i> y <i>Rigidoporus</i>	13
Figura 6 Actividad enzimática de <i>Ganoderma</i> , <i>Leiotrametes</i> y <i>Rigidoporus</i> en los días con mayor actividad enzimática (lacasa).....	14
Figura 7 Determinación cuantitativa de lacasa al día 4.....	15

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Identificación de cepas fúngicas con su respectivo código # y letra.....7

Tabla 2.- Resultados finales del promedio de crecimiento mm/d, Crecimiento en diferentes medios ligninolíticos; C Las columnas de reacción del ácido gálico indican; A: amarillo, C: Café, AC: amarillo-café, y % MGI (0.1).....11

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN

Revista

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas de la PUCE

Título

Evaluación del potencial micorremediador de siete cepas de hongos de los géneros *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* mediante la determinación de su actividad enzimática.

Autores

Byron David Molina Espinoza

Correo electrónico

bdmolina@puce.edu.ec

Dirección

Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Evaluación del potencial micorremediador de siete cepas de hongos de los géneros *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* mediante la determinación de su actividad enzimática.

Evaluation of the mycoremediation potential of seven strains of fungi from the genera *Ganoderma*, *Leiotrametes* and *Rigidoporus* by determining their enzymatic activity.

David Molina

Recibido: 2023/ Aceptado: 2023

Palabras clave: Biorremediación, contaminación, enzimas ligninolíticas, lacasa, TPHs.
Keywords: Bioremediation, contamination, laccase, ligninolytic enzymes, TPHs.

RESUMEN

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) son contaminantes que provienen de actividades como la exploración y refinación de petróleo, derrames, fugas y emisiones industriales. Estos compuestos tienen baja densidad y capacidad de emulsificación, lo que los convierte en contaminantes persistentes en aguas y suelos, afectando a la flora, la fauna y al ser humano. En Ecuador, la presencia de TPHs en suelos y fuentes naturales de agua, especialmente en la región amazónica, generó graves consecuencias ambientales y afectó a las comunidades indígenas que dependían de estos recursos. La micorremediación por hongos de la pudrición blanca surgió como una alternativa innovadora para este problema, debido a que estos hongos cuentan con enzimas capaces de degradar eficazmente los TPHs y otros compuestos contaminantes. Esta estrategia respetuosa con el medio ambiente ofrece ventajas para la biorremediación y tiene un gran potencial en la eliminación de compuestos tóxicos y persistentes en el medio ambiente. En el presente estudio se tuvo como objetivo evaluar el potencial micorremediador de siete cepas de hongos de los géneros *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* mediante la aplicación de pruebas de cribado rápido y determinación de lacasa (lac) por espectroscopia visible, cuatro de ellas cualitativas y una cuantitativa. Se utilizaron diferentes métodos para determinar la producción de la enzima lacasa (lac), peroxidasa (per) y otras enzimas ligninolíticas en hongos, estas se evaluaron mediante pruebas de RBBR, ácido gálico y el guaiacol, lo que produjo un cambio de color o decoloración en el medio de cultivo. También se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento miceliar frente a TPHs mediante su exposición en un medio de cultivo.

Además, se evaluó la producción de lac mediante la técnica de espectrofotometría UV-visible. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando la correlación de Spearman con las variables obtenidas. Dos cepas de hongos mostraron alta actividad enzimática de lacasa, respaldando su potencial para degradar TPHs. Sin embargo, una cepa que exhibió actividad ligninolítica, no fue específica para los ensayos de lacasa y peroxidasa, a pesar de exhibir actividad ligninolítica. El análisis estadístico no mostró correlación lineal, destacando la importancia de investigaciones adicionales para comprender el potencial micorremediador de los hongos analizados.

ABSTRACT

Total petroleum hydrocarbons (TPHs) are pollutants that come from activities such as oil exploration and refining, spills, leaks, and industrial emissions. These compounds have low density and emulsification capacity, which makes them persistent pollutants in water and soil, affecting flora, fauna and humans. In Ecuador, the presence of TPHs in soils and natural water sources, especially in the Amazon region, generated serious environmental consequences and affected the indigenous communities that depended on these resources. Mycoremediation by white rot fungi emerged as an innovative alternative for this problem, since these fungi have enzymes capable of efficiently degrading TPHs and other polluting compounds. This environmentally friendly approach offers advantages for bioremediation and has great potential in removing toxic and persistent compounds in the environment. The objective of this study was to evaluate the mycoremediation potential of seven strains of fungi of the genera *Ganoderma*, *Leiotrametes* and *Rigidoporus* by applying rapid screening tests and laccase (lac) determination by visible spectroscopy, four of them qualitative and one quantitative. Different methods were used to determine the production of the enzyme laccase (lac), peroxidases (per) and other ligninolytic enzymes in fungi, these were evaluated by RBBR, gallic acid and guaiacol tests, which produced a color change or discoloration in the culture medium. The percentage of mycelial growth inhibition against TPHs was also determined by exposing them to a culture medium. In addition, lac production was evaluated using the UV-visible spectrophotometry technique. Statistical analysis of the data was performed using Spearman's correlation with the variables obtained. Two fungal strains showed high laccase enzyme activity, supporting its potential to degrade TPHs. However, a strain that exhibited ligninolytic activity was not specific for laccase and peroxidase assays, despite exhibiting ligninolytic activity. Statistical analysis did

not show a linear correlation, highlighting the importance of further research to understand the mycoremediation potential of the fungi analyzed.

1. INTRODUCCION

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) son contaminantes hidrófobos difíciles de degradar que forman parte de mezclas de alifáticos, aromáticos, resinas y asfáltenos (Tran et al., 2021). Estos compuestos se originan principalmente debido a las actividades de exploración y refinación de petróleo, derrames, fugas de tanques de almacenamiento subterráneos y descargas industriales (Rong et al., 2021). La presencia de TPHs en suelos y aguas, a menudo como resultado de la deposición atmosférica (Shen, 2005), los convierte en contaminantes persistentes que afectan negativamente la flora, fauna y seres humanos. Los TPHs se consideran compuestos perjudiciales y se ha demostrado que tienen propiedades cancerígenas, tóxicas, mutagénicas y teratogénicas (Zhang, 2020).

En Ecuador, un país con una gran biodiversidad y numerosas áreas protegidas, la contaminación por TPHs se ha convertido en una preocupación importante. La presencia de oleoductos, como el Sistema de Oleoducto Transecuatoriano (SOTE), ha llevado a

la contaminación de suelos y fuentes de agua naturales en la región amazónica (España, 2022). Esto ha afectado gravemente los ecosistemas y ha impactado a comunidades indígenas que dependen de estas fuentes de agua y alimentos (Loaiza, 2022). La contaminación por TPHs también se ha informado en parques nacionales y reservas ecológicas, amenazando la flora, fauna y los sistemas de producción (Moran, 2020).

La presencia de TPHs en el suelo tiene graves consecuencias para sus funciones y estructura, alterando el pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, contenido de carbono orgánico, estabilidad de los agregados y retención de agua, entre otros (Castellanos et al., 2015). Además, los TPHs afectan negativamente la flora, fauna y microorganismos del suelo (Madigan et al., 1999), generando impactos significativos en la salud, economía y formas de vida de las poblaciones locales (Cavazos-Arroyo et al., 2014).

La gravedad de la contaminación por TPHs en Ecuador y su impacto en los ecosistemas y comunidades ha llevado a

la necesidad de remediar el suelo y atender las consecuencias. La micorremediación, que implica el uso de hongos, se ha propuesto como una alternativa innovadora para eliminar los TPHs. Los hongos presentes en los hábitats contaminados han desarrollado respuestas celulares que les permiten degradar los contaminantes mediante enzimas (Marcial, 2023).

En particular, los hongos de pudrición blanca con actividad enzimática ligninolítica han demostrado ser efectivos en la eliminación de compuestos contaminantes como los TPHs. Su capacidad para degradar estos contaminantes ha despertado interés en la comunidad científica y se han realizado numerosos estudios que demuestran su eficacia (Kameshwar & Qin, 2017). Las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa presentes en estos hongos desempeñan un papel crucial en la degradación de los TPHs y otros compuestos orgánicos tóxicos (Touhar et al., 2014). Además, los hongos de pudrición blanca tienen características ecológicas y metabólicas importantes que los convierten en candidatos ideales para la biorremediación de TPHs y otros contaminantes (Cabrera, 2015).

La biorremediación por hongos de pudrición blanca ofrece una alternativa eco amigable a los métodos químicos y físicos tradicionales para la eliminación de TPHs. Estos hongos son capaces de eliminar, tolerar y absorber los TPHs mediante la actividad enzimática ligninolítica, evitando así la contaminación del medio ambiente y la generación de subproductos tóxicos (Akthar, 2020). Su aplicación tiene un amplio espectro de posibilidades y se ha demostrado su eficacia en la degradación de diferentes compuestos contaminantes (Batista et al., 2017).

En este contexto, se han planteado las siguientes preguntas de investigación: ¿Qué cepas presentan la mayor actividad enzimática? ¿Cuáles de ellas presentan mayor potencial para su aplicación en micorremediación? Este trabajo busca identificar que cepas fúngicas ecuatorianas de los géneros *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* endémicas del parque Yasuní presentan mayor actividad enzimática la cual se relaciona con su potencial de degradar hidrocarburos y por ende ser usadas para aplicaciones biotecnológicas en micorremediación.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepas fúngicas y químicos

Todos los hongos utilizados en este proyecto fueron recolectados en el parque Yasuní en el mes de agosto del 2022, el proceso de aislamiento, purificación e identificación molecular fue realizado en el laboratorio de micología de Nayón. Se contó con cepas de trabajo con las que se realizaron todos los ensayos que hicieron parte de esta investigación. Los hongos utilizados son de la división Basidiomycota de los géneros *Ganoderma*, con las especies; *weberianum*, *stiptatum*, *ecuadoriense* y *resinaceum*. También del género *Leiotrametes*, especie *meziensii*. Por último, del género *Rigidoporus* (ver Tabla 1). Todos los hongos son pertenecientes al grupo de los no esporulados.

Tabla 1 Identificación de cepas fúngicas con su respectivo código # y letra.

Código	Cepas	Origen	Código #
A	<i>Leiotrametes meziensii</i>	Ecuador	2210
B	<i>Rigidoporus microporus</i>	Ecuador	08082205
C	<i>Ganoderma resinaceum</i>	Ecuador	51480
D	<i>Ganoderma stiptatum</i>	Ecuador	51468
E	<i>Ganoderma ecuadoriense</i>	Ecuador	51467
F	<i>Ganoderma weberianum</i>	Ecuador	22
G	<i>Rigidoporus sp.</i>	Ecuador	12

2.2 Temperatura de crecimiento

Se inoculó un disco de 5 mm de diámetro de cada especie fúngica de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* en Agar Extracto de Malta (MEA) utilizando la técnica sándwich. Los hongos se incubaron en quintuplicado a 24 °C y 30 °C durante 8 días para determinar su temperatura óptima de crecimiento. La tasa de crecimiento se midió en mm/día.

2.3 Prueba de decoloración de tinte

Se inoculó MEA con 50 mg/L de RBBR por la técnica sándwich utilizando un disco de 5 mm de diámetro (previamente cultivado por 14 días) de cada especie de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* para determinar la producción de lacasa (Batista et al., 2017). Se realizaron pruebas por quintuplicado. Las placas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento y se analizaron visualmente cada dos días para determinar la decoloración total en la placa de Petri en mm/día.

2.4 Prueba de guaiacol

Se inoculó MEA con 0,2% (v/v) de guaiacol por la técnica sándwich utilizando un disco de 5 mm de diámetro (previamente cultivado por 14 días) de cada especie de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* para

determinar la producción de lacasa y peroxidasa. Se evaluó la actividad de enzimas ligninolíticas mediante la oxidación de guaiacol, que generó una coloración marrón rojiza como resultado de la reacción (Batista et al., 2017). Se realizaron pruebas por triplicado. Las placas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento y se analizaron visualmente cada dos días para determinar la formación del color marrón rojizo.

2.5 Prueba de ácido gálico

Se inoculó MEA con 0,45 g/L de ácido gálico por la técnica sándwich utilizando un disco de 5 mm de diámetro (previamente cultivado por 14 días) de cada especie de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* para determinar la producción de enzimas ligninolíticas. Se evaluó la actividad de enzimas ligninolíticas mediante la oxidación de ácido gálico, que generó una coloración marrón como resultado de la reacción (Batista *et al.*, 2017). Se realizaron pruebas por triplicado. Las placas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento y se analizaron visualmente cada dos días para determinar la formación del color marrón.

2.6 Tolerancia diésel

Se inoculó por quintuplicado en MEA con 0,1% y 0,1% de Tween 80 por la técnica sándwich utilizando un disco de 5 mm de diámetro (previamente cultivado por 14 días) de cada especie de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* para evaluar la tolerancia de los hongos al diésel. El diésel y el Tween se esterilizaron por filtración (0,2 µm). Además, se realizó un cultivo control con las 7 especies, inoculándolas en placas de MEA sin diésel. Las placas se incubaron durante 7 días a 24°C. Después de los siete días, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (%ICM) (Ebadzadsahrai, Higgins Keppler, Soby y Bean, 2020).

$$\%ICM = 100 * ((GC - GT) / GC)$$

Dónde:

GC (control de crecimiento) es el diámetro medio de los hongos cultivados en MEA.

GT (tratamiento de crecimiento) es el diámetro medio de tres réplicas de hongos expuestos al diésel.

2.7 Determinación cuantitativa de lacasa

La determinación de actividad enzimática se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL del medio mineral basal Tien y Krik (1988). Este medio salino estimula la producción de enzimas ligninolíticas.

Su composición por litro era: 0,2 g tartrato amónico, 3,28 g acetato sódico, 0,002 g tiamina, 2 g KH_2PO_4 , 0,53 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g CaCl_2 , 0,001 g CuSO_4 , 0,005 g MnSO_4 , 0,0001 g H_3BO_3 , 0,0001 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g CoCl_2 , 0,01 g NaCl y 0,001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El experimento se realizará a 25°C y 75 rpm. La actividad de lacasa fue medida durante 30 días cada dos días por espectrofotómetro UV-Vis. Se utilizó una solución 0,5 mM de ABTS y un tampón citrato/fosfato pH 4 a 420 nm (ϵ : 36000).

2.8 Control de calidad

Se utilizó la cepa de *Trametes versicolor* como control positivo de todos los ensayos, ya que esta cepa ha sido ampliamente estudiada y se conocía su alta actividad enzimática. De igual forma se utilizaron blancos como control negativo en todos los casos.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática y la decoloración del tinte RBBR fueron utilizados para realizar un análisis estadístico utilizando el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar la relación entre las diferentes variables obtenidas de las cepas de hongos y su actividad enzimática. El objetivo principal fue

determinar si existía una correlación significativa entre estas dos variables en el contexto de la evaluación de su capacidad para la remediación de contaminantes ambientales como los TPHs.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Temperatura de crecimiento óptima

Los resultados pueden verse afectados por las condiciones en que se realizan las pruebas. En este estudio se realizaron ensayos de temperatura de crecimiento para determinar aquella más óptima para los hongos, se consideró que 30°C es la temperatura óptima para la mayoría de los hongos (ver Figura 1), a excepción de la cepa G que presentó mejores resultados en 24°C con un valor promedio de crecimiento mm/d de 11 (ver Figura 2). Este resultado se debe a que no se pudo determinar el promedio real de crecimiento mm/d en 30°C ya que, en este ensayo hubo la presencia de un contaminante biológico en el medio empleado con la cepa G, lo cual inhibió o compitió con el hongo por espacio y nutrientes. Como consecuencia se obtuvo un valor promedio de crecimiento menor al esperado, el valor promedio de crecimiento mm/d en la cepa G a 30°C fue de 4. Conviene

subrayar que en Umanu *et al* (2013), se considera que la temperatura óptima para esta clase de ensayos de biorremediación oscila entre 28°C y 31°C. Es probable que se obtenga variación en los resultados modificando la temperatura de experimentación.

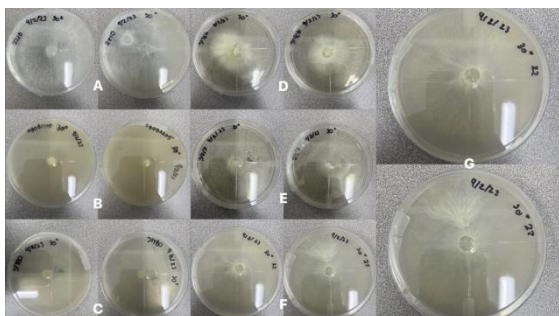


Figura 1 Ensayo de temperatura a 30 °C de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus*.

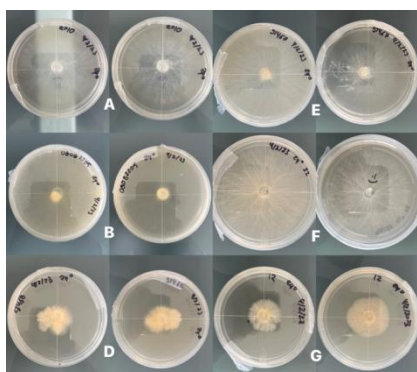


Figura 2 Ensayo de temperatura a 24 °C de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus*.

3.2 Pruebas rápidas para la determinación de actividad enzimática en medio sólido: ácido gálico, guaiacol y RBBR.

El potencial micorremediador en las pruebas de ácido gálico, guayacol y RBBR presentó disimilitudes entre todos los hongos a analizar. Se pudo observar que las cepas B, C y G (42%)

presentaron crecimiento miceliar en las distintas pruebas para determinación de producción de lacasa y peroxidasa con RBBR y guaiacol, pero no presentó cambio de coloración por la actividad enzimática con el reactivo utilizado (ver Tabla 2).

Para la decoloración del tinte RBBR, la enzima lacasa actúa oxidando y degradando los compuestos antraquinonas, durante la reacción se forman radicales libres y compuestos quinónicos. Como consecuencia de esto, se produce la ruptura y descomposición de la estructura molecular del tinte, lo cual ocasiona un cambio en su coloración. Esto se debe a que los grupos cromóforos responsables de su tonalidad sufren modificaciones o son eliminados (Parimelazhagan *et al.*, 2022). Gao *et al.*, 2023 informó que los compuestos originales o productos de antraquinona inhiben el crecimiento de hongos. Esta es una razón por la cual el crecimiento y degradación de RBBR fue variable en las cepas de hongos analizadas.

Por otro lado, la oxidación del guaiacol es una prueba comúnmente utilizada para evaluar la actividad de estas enzimas en estudios de

Tabla 2.- Resultados finales del promedio de crecimiento mm/d, Crecimiento en diferentes medios ligninolíticos; C Las columnas de reacción del ácido gálico indican; A: amarillo, C: Café, AC: amarillo-café, y % MGI (0.1)

Código	Cepas	Origen	Código#	Promedio de crecimiento mm/d		Crecimiento en diferentes medios ligninolíticos			% MGI (0.1)
				30 °C	24 °C	RBBR Tasa de crecimiento mm/d	GUAIACOL	GÁLICO	
A	<i>Leiotrametes menziesii</i>	Ecuador	2210	11	11	16	+	-	7,52
B	<i>Rigidoporus microporus</i>	Ecuador	8082205	12	12	0	-	A	0
C	<i>Ganoderma resinaceum</i>	Ecuador	51480	12	12	6	-	A	24,70
D	<i>Ganoderma stiptatum</i>	Ecuador	51468	6	5	7	+	AC	41,17
E	<i>Ganoderma ecuadoriense</i>	Ecuador	51467	4	11	15	-	A	100
F	<i>Ganoderma weberianum</i>	Ecuador	22	11	10	6,62	+	-	7,35
G	<i>Rigidosporus sp.</i>	Ecuador	12	4	4	0	-	-	62,94

biorremediación. Por lo general, las enzimas lacasa y peroxidasa oxidan el grupo hidroxilo (-OH) (Ghamsari *et al.*, 2007) a forma de aldehído que produce coloración marrón rojiza (ver Figura 3) (Batista *et al.*, 2017).

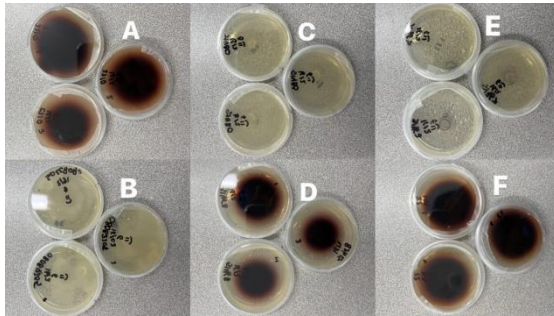


Figura 3 Prueba guaiacol de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus*.

Adicionalmente, en las pruebas de determinación de enzimas ligninolíticas con ácido gálico el 57 % de todas las cepas reaccionaron formando una coloración marrón variable, el otro 43% tuvieron crecimiento micelial, pero no hubo cambio de coloración (ver Tabla 2). Sin embargo, las cepas A y F (28%) fueron las que mejor tasa de crecimiento mm/d de RBBR (ver Figura 4). En este trabajo sostenemos que el resultado deficiente obtenido en la prueba de ácido gálico se debe a la falta de actividad de lacasa, peroxidasa, peroxidasa versátiles u otras enzimas específicas que están involucradas en la oxidación del reactivo a analizar (Reyes, 2014). La actividad de enzimas ligninolíticas induce la oxidación del ácido gálico, generando una forma quinónica que se caracteriza por su coloración marrón (Batista *et al.*, 2017). El ácido gálico al igual que el RBBR,

forman parte de los compuestos que inhiben el crecimiento de hongos (Gao *et al.*, 2023), por ende su actividad enzimática se ve afectada. Por esta razón las cepas A y F que presentan mejor potencial micorremediador, pero no formaron la coloración marrón en la prueba de ácido gálico.

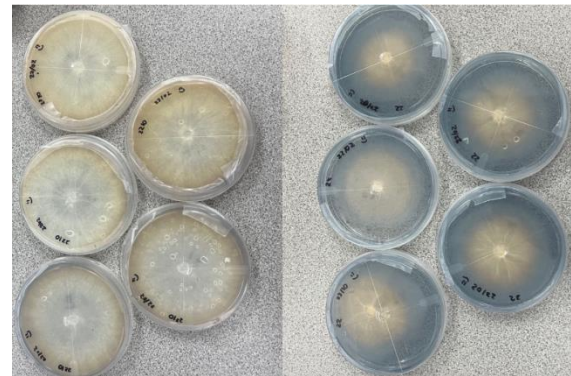


Figura 4 Cepas A y F con mejor tasa de crecimiento mm/d en RBBR.

Se evaluó el potencial micorremediador de los extractos enzimáticos crudos extracelulares producidos por las cepas a evaluar mediante pruebas rápidas de determinación enzimática. Hasta ahora, pocos estudios mencionan el potencial biorremediador de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* para TPHs. Del 100% de cepas el 28 % mostraron una mayor actividad enzimática con la posible capacidad de degradar estos TPHs (ver Figura 1). Torres *et al.*, (2019) estudiaron la capacidad enzimática de siete cepas de *Ganoderma spp.* para degradar PAH, una clase dentro del grupo de los TPHs. En García *et al.*, (2015) se reportó

resultados similares en cuanto a la degradación de *Ganoderma spp.* y otros hongos frente al mismo compuesto contaminante.

3.3 ICM 0.1%

El mejor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial frente a TPHs fue del 7,35 % (ICM) y 78,75 (GT) por parte de *Ganoderma weberianum* sp (ver Figura 5 y Tabla 2). (Los resultados de este estudio sugieren que hongos de pudrición blanca cuentan con capacidad para degradar TPHs podrían potencialmente emplearse en procesos de biorremediación.) Por otro lado, la cepa B obtuvo un porcentaje de inhibición de crecimiento micelial frente a TPHs del %0 (ICM) y 85 (GT), también conviene subrayar que esta cepa presentó crecimiento micelial, pero no reacción con el reactivo en las pruebas de determinación de enzimas lac y per (ver Tabla 2). Probablemente, esto se deba a que esta cepa presentó actividad de enzimas ligninolíticas en la prueba de ácido gálico, las cuales están involucradas en la posible degradación de TPHs al presentar los resultados obtenidos en las pruebas de ICM 0,1%. Según Batista *et al* (2017) sugiere que las cepas con un %ICM < 30%, se consideran cepas tolerantes. En base a esto, el 43 % de las cepas analizadas en

el presente estudio se consideran tolerantes. Es importante tener en cuenta que la tolerancia a ciertas condiciones o sustancias en los hongos no garantiza necesariamente un potencial micorremediador óptimo o la mejor actividad enzimática.

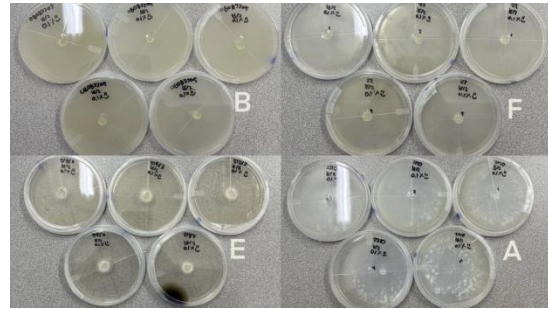


Figura 5 ICM 0.1% de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus*.

3.4 Determinación cuantitativa de lacasa

En el presente estudio, se realizaron aislamientos de siete especies de hongos de pudrición blanca provenientes del Parque Yasuní. Se observó que en el día 16 se registró la máxima actividad enzimática entre todas las muestras analizadas. Se identificaron 2 hongos que presentaron la tasa promedio más alta de actividad enzimática en el día 16 del ensayo, del 9,4 UL-1 y 308,80 UL-1 en las cepas A y F, respectivamente. En la cepa A en el día 12 hubo una actividad de lacasa del 62,63 UL-1 que fue descendiendo hasta el día 16. En cambio en la cepa F en el día 12 se obtuvo una actividad de lacasa de 1,31 UL-1 que fue ascendiendo

considerablemente hasta el día 16. Las cepas B, C, D, E y G mostraron el mismo patrón de resultados que la cepa A. En particular, en el día 16 se observó una actividad enzimática nula o mínima en todas estas cepas. Por ejemplo, las cepas B y D presentaron una actividad enzimática de 0,2 UL-1 y 0,1 UL-1, respectivamente.

Podemos comparar los resultados obtenidos en nuestro estudio con Batista *et al* (2017), donde el valor de la tasa promedio más alta de actividad enzimática fue de 541.1 UL-1 y 421.3 UL-1, respectivamente por parte de las cepas *P. chrysospori* y *T. hirsuta*. Estos dos hongos al igual que los hongos que se utilizaron en el presente estudio se forman parte del Orden de los Polyporales, además la cepa F que se considera la de mayor actividad enzimática, no llega a ser similar a Batista, existe una diferencia entre los valores de actividad enzimática a comparación del presente estudio. En cambio, para la tasa promedio más baja se obtuvo como resultado 23.1 UL-1 por parte de *Pseudogymnoascus* sp., en comparación a los resultados obtenidos en el presente estudio, las cepas analizadas no poseen actividad enzimática viable y sostenible.

De acuerdo a Casieri *et al* (2010) podemos confirmar que diferentes cepas de la misma especie y diferentes especies del mismo género muestran gran variabilidad en los niveles de enzimas ligninolíticas al evaluar la actividad ligninolítica, esto también lo podemos observar en el gráfico de barras de los 3 días con mayor actividad enzimática (Ver Figura 6).

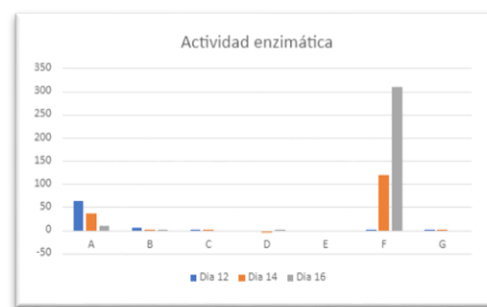


Figura 6 Actividad enzimática de *Ganoderma*, *Leiotrametes* y *Rigidoporus* en los días con mayor actividad enzimática (lacasa).

En cuanto a la actividad enzimática de la lacasa se puede medir mediante la variación de la absorbancia a lo largo del tiempo. En este estudio, se realizó la medición de la variación de la absorbancia de la enzima lacasa en un período de 30 días cada dos días. Esto permite seguir la actividad enzimática a lo largo del tiempo y determinar cómo varía a medida que de su absorción de luz (Muñoz, 2017). Las reacciones cinéticas se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, utilizando una longitud de onda específica (420 nm) para la detección de

la actividad de la lacasa (Batista *et al*, 2017). Durante el experimento, se añadió un sustrato específico, como ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) que es oxidado por la lacasa, este pierde su carga y, como resultado, da origen a un producto coloreado de color verde/inoloro (Montoya *et al*, 2014), la intensidad de este dependerá de los días transcurridos en el que se haga la lectura, la cepa F presento una ligera coloración verde al día 4 (ver Figura 7). La enzima lacasa se encarga de transferir electrones al radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, reduciéndolo a su forma neutral (ABTS). Esta reacción se utiliza como una medida de la actividad enzimática de lacasa (Collins *et al.*, 1998).

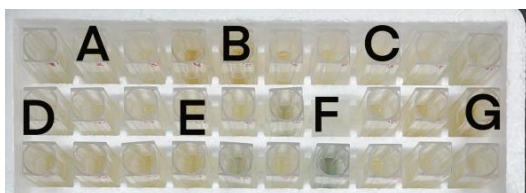


Figura 7 Determinación cuantitativa de lacasa al día 4. La interpretación de los resultados obtenidos de las reacciones cinéticas de la enzima lacasa permite evaluar el potencial biorremediador de los hongos. Como resultados del presente estudio tenemos una disminución o falta de actividad enzimática a lo largo del tiempo por parte de la enzima lacasa, esto indica que la capacidad de los

hongos analizados para degradar los contaminantes es muy baja.

3.5 Análisis estadístico y relación cuantitativa y cualitativa de las variables: actividad enzimática, RBBR e ICM.

En el análisis estadístico, se analizaron las variables de decoloración del tinte RBBR y el día con mayor producción de lacasa, también el ICM 0.1% y el día con mayor producción de lacasa con un nivel de significancia del 5% (alfa 0.05), ya que al tomar un nivel de significancia del 10% se considera que los resultados no son suficientemente "significativos" como para rechazar la hipótesis nula y considerar que existe una diferencia o relación real en los datos. También al tomar un nivel de significancia del %5, nos aseguramos de que la relación entre la actividad enzimática y el potencial de micorremediación es muy probable que no sea resultado del azar. Como resultado del análisis entre la variable de RBBR y la producción de lacasa se obtuvo un coeficiente de correlación de rho de 0.60909, para el análisis de las variables de RBBR y la variable de ICM 0.1% se obtuvo un coeficiente de correlación de rho de 0.4684875. En base al análisis estadístico se tiene como conclusión que, existe suficiente evidencia estadística para aceptar la

hipótesis nula, por ello se determina que no hay una correlación directa significativa entre la producción de lacasa y la degradación del RBBR, se obtuvieron los mismos resultados entre la variable de RBBR y la variable de inhibición de crecimiento micelial. Los resultados de la correlación de Spearman entre la actividad enzimática y el potencial micorremediador de hongos indican la ausencia de una correlación significativa entre estas variables.

En otras palabras, los hallazgos sugieren que no hay una relación importante entre la actividad enzimática de los hongos estudiados y su capacidad para remediar los TPHs. Esto puede implicar que existen otros factores o mecanismos distintos a la actividad enzimática que influyen en la capacidad de los hongos para llevar a cabo la remediación.

En lo que respecta a la relación entre la prueba cualitativa de la decoloración del RBBR y la prueba cuantitativa de la enzima lacasa. En un estudio reciente, Gao *et al* (2023) sugiere que una degradación acelerada de los tintes de antraquinona como RBBR pudiera evitar la necesidad de incrementar la producción enzimática de los hongos. Tal es el caso de la cepa E, que obtiene una buena tasa de crecimiento mm/d en

RBBR, pero la producción de lacasa fue una de las más bajas entre todas las cepas. En cambio, las cepas A y F presentaron una tasa de crecimiento mm/d en RBBR en menos de 5 y 7 días, respectivamente. Además, estos hongos fueron los que mayor producción de lacasa presentaron a comparación de los demás hongos analizados. Por lo tanto, del 100% de cepas el 28% existe relación en las pruebas cualitativas y cuantitativas realizadas.

4. CONCLUSIONES

Se determinó que las siete cepas fúngicas analizadas no presentan buen potencial micorremediador. Las pruebas para producción de enzimas muestran diferencias entre los hongos analizados, especialmente en las pruebas con ácido gálico y guaiacol. Se sugiere que el crecimiento observado en las pruebas se debe a la falta de actividad de enzimas como la lacasa y las peroxidasa, que son sumamente importantes en la actividad enzimática en el proceso de micorremediación. Las pruebas rápidas no son tan efectivas para la determinación de actividad enzimática, también la interferencia de otras sustancias presentes pueden dar falsos positivos en las pruebas rápidas y no necesariamente sea una relación con la actividad enzimática. El 43% presento

tolerancia al diésel, sin embargo, en la determinación cuantitativa de lacasa, este porcentaje no presento valores que lleguen a ser sustentables en cuanto a su potencial micorremediador o se relacione con el mismo.

REFERENCIAS

- Akhtar, N., & Mannan, M. A. (2020). Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 26, e00452. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>
- Álvarez-Barragán, J., Cravo-Laureau, C., Wick, L. Y., & Duran, R. (2021). Fungi in PAH-contaminated marine sediments: Cultivable diversity and tolerance capacity towards PAH. *Marine pollution bulletin*, 164, 112082. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112082>
- Batista-García, R. A., Kumar, V. V., Ariste, A., Tovar-Herrera, O. E., Savary, O., Peidro-Guzmán, H., González-Abradelo, D., Jackson, S. A., Dobson, A. D. W., Sánchez-Carbente, M. D. R., Folch-Mallol, J. L., Leduc, R., & Cabana, H. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *Journal of environmental management*, 198(Pt 2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.010>
- Cabrera Taco, L. M. (2015). Técnicas biológicas para la degradación de contaminantes (Bachelor's thesis, PUCE).
- Casieri, L., Anastasi, A., Prigione, V., & Varese, G. C. (2010). Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 483-504.
- Castellanos, Martha L, Isaza, Raimar J, & Torres, Julio M. (2015). Evaluación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) sobre suelos urbanos en Maicao, Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 11-17. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55605>
- Cavazos-Arroyo, Judith, Pérez-Armendáriz, Beatriz, & Mauricio-Gutiérrez, Amparo. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550. Recuperado en 09 de

abril de 2023, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722014000400006&lng=es&tlng=es.

Collins, P. J., Dobson, A. D., & Field, J. A. (1998). Reduction of the 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese. *Applied and environmental microbiology*, 64(6), 2026-2031.

Domínguez-Guilarte, O. L., Ramos-Leal, M., Sánchez-Reyes, A., Manzano-León, A. M., Argüelles-Álvarez, J., Sánchez-López, M. I., & Guerra-Rivera, G. (2011). Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(2), 51-59.

Ebadzadsahrai, G., Higgins Keppler, E., Soby, S. and Bean, H., 2020. Inhibition of Fungal Growth and Induction of a Novel Volatilome in Response to *Chromobacterium vaccinii* Volatile Organic Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01035>

Elena, C. C., Ahmed Amaury, R. M., & Lidia, G. M. (2021, septiembre). LA ENZIMA LACASA: PROPUESTA INNOVADORA PARA LA

BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DEL MUNICIPIO SANTA CLARA. In AMBIMED 2021.

Elhusseiny, S. M., Amin, H. M., & Shebl, R. I. (2019). Modulation of laccase transcriptome during biodegradation of naphthalene by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 22(2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00041-5>

Gao, Y., Croze, B., Birch, Q. T., Nadagouda, M. N., & Mahendra, S. (2023). Sorghum-grown fungal biocatalysts for synthetic dye degradation. *Water Research X*, 19, 100181.

García Guzmán, M. B., & Villegas Vélez, M. B. (2015). *Estudio de la eficiencia biodegradadora de organismos fúngicos en resina fenólica* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

Ghamsari, L., Keyhani, E., & GOLKHOUS, S. (2007). Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting.

Kameshwar, A. K. S., & Qin, W. (2017). Qualitative and quantitative methods for isolation and characterization of lignin-modifying

- enzymes secreted by microorganisms. *BioEnergy Research*, 10(1), 248-266.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 1999. Brock: Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. Octava Edición. 1064 p.
- Marcial, M. (2023). Respuesta microbiana a los contaminantes [Presentación]. Curso de Ecotoxicología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Montoya, S., Sánchez, O. J., & Levin, L. (2014). Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 12(2), 115-124.
- Muñoz Miranda, I. A. (2007). Análisis cinético de reacciones complejas mediante espectrofotometría.
- Okparanma, R. N., Ayotamuno, J. M., Davis, D. D., & Allagoa, M. (2011). Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated oil-based drill-cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 10(26), 5149-5156.
- Parimelazhagan, V., Yashwath, P., Arukkani Pushparajan, D., & Carpenter, J. (2022). Rapid removal of toxic remazol brilliant blue-r dye from aqueous solutions using *Juglans nigra* shell biomass activated carbon as potential adsorbent: Optimization, isotherm, kinetic, and thermodynamic investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12484.
- Probes, M. (2003). Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit.
- Shen, G., Lu, Y., Zhou, Q., & Hong, J. (2005). Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere*, 61(8), 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.074>
- Reyes César, A. (2014). Estudio de la degradación de PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) por hongos no ligninolíticos aislados de suelos contaminados.
- Roshandel, F., Saadatmand, S., Iranbakhsh, A., & Ardebili, Z. O. (2021). Mycoremediation of oil contaminant by *Pleurotus florida* (P.Kumm) in liquid culture. *Fungal biology*, 125(9), 667–678. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.04.002>
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In *Methods in enzymology* (Vol. 161, pp. 238-249). Academic Press.
- Torres-Farradá, G., Manzano-León, A. M., Rineau, F., Ramos Leal, M., Thijs,

- S., Jambon, I., Put, J., Czech, J., Guerra Rivera, G., Carleer, R., & Vangronsveld, J. (2019). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by native Ganoderma sp. strains: identification of metabolites and proposed degradation pathways. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(17), 7203–7215. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09968-9>
- Touahar, I. E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J. P., & Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *The Science of the total environment*, 481, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.132>
- Umanu, G. y Dodo, D. S. (2013). Assessment of Oil-Eating Fungi Isolated from Spent Engine Oil Polluted Soil Environments. *The Pacific Journal Science and Technology*, 14 (2), 609–616.
- Vipotnik, Z., Michelin, M., & Tavares, T. (2021). Ligninolytic enzymes production during polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: effect of soil pH, soil amendments and fungal co-cultivation. *Biodegradation*, 32(2), 193–215. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09933-2>
- Zhang, X., Wang, X., Li, C., Zhang, L., Ning, G., Shi, W., ... & Yang, Z. (2020). Ligninolytic enzyme involved in removal of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Fusarium strain ZH-H2. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(34), 42969–42978.

Firma del estudiante y fecha

Byron David Molina Espinoza

Quito, 15 de junio de 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Byron David Molina Espinoza', written in a cursive style.

Firma de la directora de disertación y fecha

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Eva Isabel Cipriani Ávila', written in a cursive style.

Mtr. Eva Isabel Cipriani Ávila

Quito, 15 de junio de 2023