

Producción de enzimas ligninolíticas y biodegradación del herbicida diuron por hongos de la pudrición blanca colectados en Costa Rica, cultivados sobre rastrojo de piña.

Production of lignocellulolytic enzymes and biodegradation of diuron herbicide by white rot fungi collected in Costa Rica, grown on pineapple stubble.

Christian D. Calderón-Tenorio, Luis Porras-Reyes¹, Freylan Mena², Karla Solano-Díaz³, Maria Arias-Andrés⁴.

Resumen

En esta investigación se evaluó la capacidad de dos cepas de hongos basidiomicetos de la pudrición blanca (2922-A y 2922-B) previamente aislados de bosques costarricenses, para producir enzimas lignocelulolíticas lacasa y peroxidasas, y biodegradar diuron sobre rastrojo de piña mediante fermentación sólida. Ambas cepas mostraron actividad enzimática lacasa y peroxidasas, siendo la cepa 2922-A la que mostró mayor actividad. Como consecuencia, se escogió la cepa 2922-A para continuar el estudio. Se evaluó la tolerancia de la cepa 2922-A en diferentes concentraciones de los herbicidas ametrina, bromacil y diuron en placas Petri a 10, 20 y 30 mg/L. Una vez que se determinó la capacidad de crecer en la presencia de los herbicidas se escogió el diuron para continuar el estudio. Se probó la capacidad de la cepa 2922-A para biodegradar el herbicida diuron sobre rastrojo de piña, alcanzando un porcentaje de remoción del 53,7% de la concentración inicial de diuron a los 30 días de cultivo. Los resultados comprueban la producción de enzimas lignocelulolíticas y la biodegradación de diuron utilizando rastrojo de piña como sustrato de crecimiento para hongos basidiomicetos de la pudrición blanca.

Palabras clave: biorremediación, fermentación sólida, hongos basidiomicetos, plaguicidas, rastrojo de piña.

Abstract

This study evaluated the ability of two white rot fungi strains (2922-A and 2922-B) previously isolated in Costa Rican forests to produce laccase lignocellulolytic enzymes and peroxidases and biodegrade diuron on pineapple stubble by solid fermentation. Both strains showed laccase and peroxidases enzyme activities, with the 2922-A strain showing the highest activity. As a consequence, strain 2922-A was chosen to continue the study. The tolerance of strain 2922-A to different concentration of the herbicides ametrine, bromacil and diuron in 10, 20 and 30 mg/L was evaluated by growth inhibition in plates. Once the ability to grow in the presence of herbicides was determined, diuron was chosen to continue the study. The ability of the 2922-A strain to biodegrade the herbicide diuron on pineapple stubble was tested, achieving a removal percentage of 53.7% of

¹Investigador, Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas-CENAT-CONARE, San José, Costa Rica, lporras@cenat.ac.cr

² Académico e investigador, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional (IRET-UNA), Heredia, Costa Rica, fmena@una.cr

³ Académica e investigadora, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional (IRET-UNA), Heredia, Costa Rica, karla.solano.diaz@una.cr

⁴ Académica e investigadora, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional (IRET-UNA), Heredia, Costa Rica, maria.arias.andres@una.cr

the initial concentration of diuron. The results prove the production of lignocellulolytic enzymes and the biodegradation of diuron using pineapple stubble as a growth substrate for basidiomycete white rot fungi.

Keywords: bioremediation, solid fermentation, basidiomycete fungi, pesticides, pineapple stubble.

1. Introducción

Los hongos basidiomicetos de la pudrición blanca (HPB) son organismos capaces de degradar lignocelulosa y constituyen los organismos más eficientes para mineralizar la lignina; un biopolímero que cubre la celulosa y hemicelulosa en la madera y otros tejidos vasculares, que presenta una amplia variedad y tipos de enlaces con una naturaleza recalcitrante altamente resistente a la biodegradación (Rodríguez, Barreiro, Rivela, Longo & Sanromán, 2002; Sun, Zhang, & Zhang, 2004; Dávila & Vásquez, 2006). La mineralización de la lignina se realiza a través de un sistema enzimático inespecífico que funciona en el ambiente extracelular e involucra la producción de enzimas extracelulares denominadas enzimas ligninolíticas, que incluyen las enzimas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasas y otras oxidasas (Dávila & Vásquez, 2006; Sánchez 2009; Domínguez et al., 2010).

Para el crecimiento de los HPB y la producción de enzimas ligninolíticas, el uso de residuos agroforestales ha sido ampliamente utilizado debido a su contenido de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (García & Torres, 2003; Quintero, Feijoo & Lema, 2006). Algunos sustratos utilizados incluyen paja de trigo, aserrín, bagazo de caña, cáscara de cacao, salvado de trigo y salvado de cebada (Zeddel, Majcherczyk & Hüttermann, 1993; García & Torres, 2003; Arora & Sharma, 2009; Elisashvili et al., 2009). El rastrojo de piña (planta sin raíces), un residuo agroindustrial común en Costa Rica, no figura entre los materiales utilizados para este fin según la literatura consultada, sin embargo también contiene celulosa, hemicelulosa y lignina (García & Torres, 2003; López, Wing & Rojas 2014; Rojas 2016).

En Costa Rica, como consecuencia de la industrialización en el cultivo de piña se generan casi 300 toneladas de rastrojo por hectárea cultivada al año, ante las cuales la alternativa de tratamiento tradicional se enfoca en la degradación del material mediante el desecado con herbicidas, y posible incineración, y posterior incorporación al suelo (Quesada, Alvarado, Sibaja & Vega, 2005; López, Wing & Rojas, 2009; Ministerio del Ambiente, Energía y Telecomunicaciones, Ministerio de Agricultura y Ganadería, & Programa de Desarrollo Agroindustrial, 2009; Coto 2013; López et al., 2014). La utilización de este residuo para el crecimiento de HPB, podría contribuir a la degradación del material y generar a la vez un producto de valor agregado como lo es la producción y consecuente utilización de enzimas ligninolíticas.

El sistema enzimático inespecífico que le permite a los HPB degradar material lignocelulolítico, ha mostrado capacidad para degradar xenobióticos con estructuras químicas similares a la lignina incluyendo colorantes (Gomes et al., 2009; Heyse et al., 2010), hidrocarburos (Han, Choi & Song, 2004; Chen, Wang & Hu, 2010); compuestos farmacéuticos (Tran, Urase & Kusakabe, 2010) y plaguicidas (Bending, Friloux & Walker, 2002; Domínguez et al., 2010; Pinto et al., 2012).

La degradación de plaguicidas por estos organismos ha sido un tema de interés debido a la continua presencia y efectos adversos de estos xenobióticos en el ambiente. Si bien es cierto el uso de plaguicidas representa una mejora significativa para la producción agrícola, también se les atribuye ser causantes de contaminación en suelos y aguas superficiales (Quintero, 2011; Pinto et al., 2012; Maqbool et al., 2016). En Costa Rica, plaguicidas como ametrina, bromacil, etoprofos, diazinon, endosulfán y diuron, han sido reportados frecuentemente en aguas superficiales cercanas a la producción agroindustrial de la piña (Echeverría et al., 2012; Arias-Andrés et al., 2016; Fournier et al., 2017).

Entre los hongos de la pudrición blanca, las especies *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* han sido ampliamente estudiadas (García & Torres, 2003; Arora & Sharma, 2011). Sin embargo, la investigación sobre otras especies puede representar un mayor aprovechamiento para su aplicación en la biodegradación de xenobióticos. Tomando en cuenta que la biodiversidad terrestre de Costa Rica comprende casi un 4% del total a nivel mundial (Instituto Nacional de Biodiversidad, 2013), distribuida en diversos hábitats, es de suponer que exista una gran diversidad de hongos nativos que puedan representar alternativas con alto potencial.

Para el año 2008 el Instituto Nacional de Biodiversidad en Costa Rica (INBio), realizó una campaña de bioprospección de hongos y bacterias con actividades lignocelulolíticas en diferentes parques nacionales de Costa Rica (Rojas & Hernández, 2015). A partir de los resultados obtenidos en dicho estudio, en esta investigación se seleccionaron dos cepas que mostraron un potencial enzimático adecuado para (1) evaluar su capacidad para crecer y producir enzimas ligninolíticas peroxidasas y lacasa en una matriz sólida de rastrojo de piña a distintos niveles de pH y (2) evaluar la habilidad de una cepa para biodegradar diuron en rastrojo de piña contaminado artificialmente.

2. Metodología

2.1 Herbicidas

Se utilizaron los herbicidas ametrina, bromacil y diuron. Se emplearon materiales de referencia de la marca Dr. Ehrestorfer. Se prepararon soluciones stock en acetona y se disolvieron en agua Tipo I (ASTM) para obtener soluciones madre de ametrina (145,6 µg/mL), bromacil (313,7 µg/mL) y diuron (312,5 µg/mL). Las soluciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,2 µm y se almacenaron en botellas color ámbar a temperatura ambiente.

2.2 Microorganismos

Se utilizaron dos cepas de hongos basidiomicetos de la pudrición blanca identificados con los números 2922-A y 2922-B de la colección *ex situ* de microorganismos del INBio y que fueron aisladas de un coleóptero del género *Tenebrionidae* colectado en PN Piedras Blancas, Área de Conservación Osa, Costa Rica. Las cepas contaban con una caracterización general previa de actividad lignocelulolítica lacasa y peroxidasas, así como actividades celulolítica, β-glucosidasa, β-xilanasas y celobiosa hidrolasa (Arias-Andrés & Vázquez, 2013; Rojas & Hernández, 2015). Las cepas se mantuvieron en placas Petri de 9 cm con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) a 4 °C y se subcultivaron periódicamente cada 15 días a 30 °C durante siete días previo a su utilización en los ensayos.

2.3 Preparación de inóculo

Ocho discos (8,3 mm de diámetro) con micelio fúngico, provenientes de placas Petri con PDA con cada cepa de hongo incubadas a 30 °C por siete días, se colocaron en Erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio líquido de glucosa, extracto de malta y levadura (GMY, por sus siglas en inglés)-modificado estéril. El cultivo se incubó a 30 °C en agitación a 110 rpm por siete días. Posteriormente el cultivo se homogenizó con un Homogenizador Ultra-Turrax (marca Ika modelo T25 D S1) durante 30 segundos a 5000 rpm y la suspensión micelial homogenizada se utilizó como inóculo para los ensayos. El medio líquido GMY-modificado contenía (por litro): 10 g de glucosa; 3,5 g extracto de malta; 2 g extracto de levadura; 2 g fosfato de potasio; 0,5 g sulfato de magnesio; 0,1 g bacto peptona y 1 mL de solución de minerales. La solución de minerales contenía (por litro): 0,5 mg sulfato de cobre; 0,16 mg sulfato de manganeso; 0,14 mg de sulfato de zinc y 0,29 mg de cloruro de cobalto. El medio se ajustó a un pH de 4,5 antes de ser autoclavado (Román et al., 2010).

2.4 Caracterización del sustrato

El rastrojo de piña se colectó en la finca Cuatro Marías de INPROTSA, localizada en San Carlos de Alajuela, Costa Rica. El sustrato fue lavado, cortado, secado a 60 °C durante tres días según la norma ASTM E1757-012007 y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula de 500 μm – 2 mm. Se determinó el porcentaje de materia orgánica según el procedimiento “Determinación de materia orgánica en muestras de sedimento o de suelo por ignición” del Laboratorio de Residuos de Plaguicidas (LAREP) del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional de Costa Rica (IRET-UNA). Se evaluó el porcentaje de lignina insoluble según la norma TAPPI T 222 om-11 “Acid insoluble lignin in Wood and pulp” con las siguientes variaciones: se utilizó una muestra de 0,5 g de rastrojo de piña para los análisis y se empleó un volumen de 20 mL de ácido sulfúrico. Se determinó el contenido de carbono y nitrógeno a través del Laboratorio de Suelos y Foliaves del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

2.5 Producción enzimática lacasa y peroxidasas

Se realizó una fermentación sólida según los lineamientos expuestos por Arora y Sharma (2009) con algunas variaciones. En Erlenmeyers de 250 mL estériles, se colocaron cinco gramos de rastrojo de piña seco y se humedecieron con 21,5 mL de agua Tipo I (ASTM). El sustrato húmedo se esterilizó 40 minutos a 121 °C y se adicionó ocho mL de inóculo para alcanzar un contenido de humedad cercano al 85% y una actividad de agua cercana a uno. Como controles sin hongo, se reemplazó el inóculo con ocho mL de medio líquido GMY-modificado sin inóculo. Los Erlenmeyers fueron cerrados con un tapón de algodón, cubiertos con aluminio, sellados con papel Parafilm y se incubaron durante 35 días a 30 °C en oscuridad. Tres réplicas de los tratamientos y una del control sin hongo se procesaron los días 10, 15, 20, 25, 30 y 35 para los análisis de actividad enzimática, concentración total de proteínas e identificación de la enzima lacasa.

2.5.1 Extracción y medición de la actividad enzimática

Las actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente utilizando un lector de microplaca Lector Multi-Modal Synergy H1. El extracto enzimático se obtuvo según la

metodología descrita por Arora y Sharma (2009) con algunas variaciones; se adicionó 25 mL de amortiguador de fosfatos de sodio pH 6 (10 mM) a cada Erlenmeyer, se disgregó el material y se colocó en agitación durante 10 minutos a 120 rpm; el contenido de cada Erlenmeyer se decantó y se dividió en dos fracciones, la primera se almacenó a -80 °C para el posterior análisis de concentración de proteínas totales y la segunda se centrifugó durante 2 minutos a 10000 rpm para la medición de actividades enzimáticas; de la segunda fracción el sobrenadante obtenido se refrigeró a 4 °C y se utilizó como extracto enzimático para los análisis enzimáticos. La actividad enzimática se expresó como μmol de sustrato oxidado por mL por minuto según Ali, Khalil y Abd (2012), corregida por la concentración de proteínas totales mediante la ecuación 1.

$$U \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1} = \Delta\text{Abs} (10^6) (\epsilon\text{RCT})^{-1} \quad (1)$$

Donde ΔAbs = diferencia entre la absorbancia final e inicial; ϵ = coeficiente de extinción de cada producto; R = volumen (mL) del extracto enzimático; C = concentración de proteína (mg/mL); T = tiempo de reacción (min).

2.5.1.1 Actividad enzimática lacasa

La actividad lacasa se evaluó según lo descrito por Román, Torres, Ayala y Vásquez (2010). Se monitoreó el cambio de absorbancia en un minuto a 530 nm ($\epsilon = 64000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) debido a la oxidación de siringaldazina en amortiguador de succinato (50 μM) en tres valores de pH del amortiguador (4,5; 5 y 6). El volumen de reacción (300 μL) contenía 3 μL de extracto enzimático, 267 μL de amortiguador succinato (al pH correspondiente) y 30 μL de siringaldazina (0,5 mM). Para el blanco se mezcló 270 μL de amortiguador succinato y 30 μL de siringaldazina. Se efectuó además un control positivo con lacasa comercial extraída del hongo *Trametes versicolor* mezclando 3 μL de enzima comercial, 267 μL de amortiguador succinato y 30 μL de siringaldazina. La reacción se inició mediante la adición de la siringaldazina, midiendo la absorbancia durante 15 minutos con lecturas cada 30 segundos. Para cada tratamiento se realizaron tres mediciones a temperatura ambiente.

2.5.1.2 Actividad enzimática peroxidasas

La actividad peroxidasas se evaluó según lo descrito por Saftić-Panković, Veljovic, Pucarevic, Radovanovic y Mijic (2006). Se monitoreó el cambio de absorbancia en un minuto a 470 nm ($\epsilon = 26\ 000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) debido a la oxidación de guayacol en presencia de H_2O_2 en amortiguador de fosfato de sodio en tres valores de pH del amortiguador (4,5; 5 y 6). El volumen de reacción (300 μL) contenía 3 μL de extracto enzimático, 280 μL de amortiguador fosfatos de sodio (al pH correspondiente), 2 μL de H_2O_2 (1 mM) y 15 μL de guayacol (100 mM). Para el blanco se mezcló 285 μL de amortiguador fosfatos de sodio y 15 μL de guayacol. Se realizó además un control positivo con lacasa comercial del hongo *Trametes versicolor* mezclando 3 μL de enzima comercial, 280 μL de amortiguador fosfatos, 2 μL de H_2O_2 y 15 μL de guayacol. La reacción se inició mediante la adición del guayacol midiendo la absorbancia durante 15 minutos con lecturas cada 30 segundos. Para cada tratamiento se realizaron tres mediciones a temperatura ambiente.

2.5.2 Concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó espectrofotométricamente (590 nm) utilizando un lector de microplaca Lector Multi-Modal Synergy. Se empleó el extracto enzimático (almacenado a -80 °C) según el método de Bradford (1976), siguiendo el protocolo establecido en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot). El extracto enzimático se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.2 µm y se refrigeró a 4 °C. Se preparó una curva de calibración con patrón de albumina de suero bovino (1 mg/mL). Se tomaron tres µL del extracto enzimático filtrado o patrón de albumina y se adicionó 750 µL de reactivo Bradford. Posteriormente, se tomó una alícuota de 300 µL y se midió la concentración de proteínas totales. Cada medición se realizó por triplicado a temperatura ambiente.

2.5.3 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se efectuó una identificación de la enzima lacasa mediante electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el protocolo establecido en el CENIBiot basado en Laemmli et al (1970). Se preparó un gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor, agregando 5 mL de gel de separación pH 8,8 al 10% y 5 mL de gel de compactación pH 6,8 al 4%.

Se utilizaron los extractos enzimáticos filtrados que reportaron la mayor concentración de proteínas totales para cada día, según el apartado anterior. Se tomó 20 µL de extracto y se adicionó 20 µL de amortiguador de muestra. Se preparó un blanco mezclando 20 µL de patrón de albumina de suero bovino y 20 µL de amortiguador de muestra. Como control positivo se utilizó lacasa comercial del hongo *Trametes versicolor* (5 mg/mL), mezclando 20 µL lacasa y 20 µL de amortiguador de muestra. Las muestras se calentaron en un baño de agua a 95 °C durante 15 minutos. Se utilizó un marcador con pesos moleculares entre 225 - 10 kDa como estándar. Transcurridos los 15 min se cargaron 10 µL de las muestras a cada pozo del gel de poliacrilamida.

El gel se corrió a un voltaje constante de 100 volts, en un amortiguador de glicerina pH 8 a temperatura ambiente, durante 3 horas. Posteriormente las bandas de proteína se revelaron utilizando Azul de Coomassie G-250; el gel permaneció en reposo durante 16 horas. Finalizado el tiempo de reposo, se agregó disolución desteñidora al gel y permaneció en reposo 16 horas más.

2.6 Tolerancia del hongo a herbicidas

Para este experimento se utilizó únicamente la cepa 2922-A. Se realizó una incubación de la cepa en placas Petri de 9 cm con medio GMY-modificado sólido, suplementado con los herbicidas ametrina, bromacil y diuron individualmente, según lo descrito por Fragoeiro (2005). Al medio líquido GMY-modificado se adicionó agar técnico N°1 al 2% (m/v). El medio se dividió en Erlenmeyers de 125 mL y fueron esterilizados durante 15 min a 121 °C. Posteriormente se adicionó alícuotas de las soluciones madre de ametrina, bromacil y diuron a Erlenmeyers distintos, para obtener concentraciones finales de 10, 20 y 30 mg/L para cada herbicida. Los medios fueron agitados vigorosamente y fueron vertidos en las placas Petri. Cada placa se inoculó en el centro con un disco (8.3 mm de diámetro) con micelio fúngico, incubado previamente en placas Petri con PDA durante 7 días a 30 °C. Como control sin plaguicida se empleó medio GMY-modificado sólido sin la adición de plaguicida. Como control por solvente se utilizó medio GMY-modificado sólido

adicionado con una solución acetona/agua al 1,2% (correspondiente a la proporción de acetona presente en el medio suplementado con la mayor concentración de herbicida). Las placas se sellaron con papel Parafilm y se incubaron durante 8 días a 30 °C, en oscuridad. Cada tratamiento y control se llevó a cabo por triplicado. Para evaluar la tolerancia del hongo a herbicidas se utilizó como criterio la tasa de crecimiento del hongo expuesto a las tres concentraciones de cada sustancia. Diariamente se tomaron dos mediciones del radio de la colonia en ángulos rectos una de la otra. Se tomó la extensión del radio y se determinó la tasa de crecimiento mediante una regresión lineal. La tasa de crecimiento corresponde a la pendiente (m) en la ecuación $y=mx+b$. Se determinó además el porcentaje de inhibición según Stamatiu et al. (2015) con algunas variaciones; al finalizar el periodo de cultivo se midió el diámetro de la colonia y se determinó el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial mediante la ecuación 2.

$$PID = 100 - \left(\frac{DM_{Ttrat} * 100}{DM_{TA}} \right) \quad (2)$$

Donde DM_{Ttrat} = diámetro de la colonia a los ocho días (mm); DM_{TA} = diámetro de la colonia en el control sin plaguicida a los ocho días (mm).

2.7 Biodegradación de diuron

Para este experimento se utilizó únicamente el herbicida diuron. Se efectuó una fermentación sólida según la metodología expuesta por Masaphy, Lavenon y Henis (1996) y Arora y Sharma (2009) con las algunas variaciones. En Erlenmeyers de 125 mL estériles, se colocaron dos gramos de rastrojo de pinya seco, se humedecieron con 8,6 mL de agua de ósmosis y se esterilizaron 40 minutos a 121 °C. Al sustrato húmedo estéril se adicionó 3,2 mL de inóculo para alcanzar un contenido de humedad cercano al 85%. Como controles sin hongo, se reemplazó el inóculo con 3,2 mL de medio líquido GMY-modificado sin inóculo. Los Erlenmeyers se cerraron con un tapón de algodón, se cubrieron con aluminio, se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a 30 °C en oscuridad durante 10 días. Al cabo de 10 días se adicionó tres mL de la solución madre de diuron para alcanzar una concentración final cercana a 10 µg/g de sustrato húmedo y la incubación se continuó por 20 días más. Se realizaron dos blancos: 1) Sustrato inoculado sin la adición de diuron y 2) Sustrato sin inocular adicionado con medio líquido GMY-modificado, sin diuron. Cinco réplicas de los tratamientos, cinco de los controles sin hongo, una de los blancos (1) y (2) se procesaron los días 10, 20 y 30.

Para estudiar el efecto de la adición de diuron o acetona (presente en la solución madre) sobre la producción enzimática, se realizaron cultivos adicionales para la producción de enzimas lacasa a pH 5 y peroxidasas a pH 4,5 (pHs óptimos según apartado 2.5). Se realizó una fermentación sólida en Erlenmeyers de 125 mL en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se establecieron dos tratamientos: (1) Sustrato inoculado adicionado con tres mililitros de diuron y (2) Sustrato inoculado adicionado con tres mL de una solución agua/acetona (4,4%). La adición de diuron o acetona se realizó a los 10 días de incubación. Como controles sin hongo, el inóculo se reemplazó con tres mililitros de medio líquido GMY-modificado sin inóculo, sin diuron o acetona. Tres réplicas de los tratamientos (1) y (2), y una del control sin hongo se procesaron los días 10, 20 y 30.

2.7.1 Extracción de la muestra

Para la extracción de diuron se utilizó el método de QuEChERS modificado con acetato de etilo validado en el LAREP. De cada Erlenmeyer se tomaron 10 g de rastrojo de piña húmedo y se adicionaron 20 mL de acetato de etilo. Posteriormente se adicionaron 3 g de bicarbonato de sodio y 10 g de sulfato de sodio. La muestra se agitó mecánicamente, se homogenizó luego con un Homogenizador Ultra-Turrax y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Del sobrenadante obtenido se tomó 1 mL y se adicionó 25 mg de PSA Bonded Silica y 25 de Graphene Carbon Black. La muestra se agitó 30 segundos y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se transfirió a viales de vidrio y se concentró a 3 μ L con corriente de nitrógeno para cambiar la mezcla MeOH:H₂O 10:90.

2.7.2 Cuantificación de la muestra

La concentración de diuron se cuantificó por cromatografía líquida de alto rendimiento. Los extractos fueron inyectados en un equipo cromatógrafo líquido marca Waters modelo Acquity Class H acoplado a un detector MS/MS Xevo TQS micro marca Water, con una columna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m. La fase móvil del solvente A fue agua con 0,1 % de ácido fórmico y la fase móvil del solvente B fue metanol con 0,1 % de ácido fórmico. El gradiente del programa utilizado fue de 90% de solvente A (0-11 min), 10 % de solvente A (11-13.10) y finalmente de 90 % de A (13.10-16 min). Para la cuantificación del diuron se utilizó un estándar preparado a partir del material de referencia Dr. Ehresntorfer disuelto en metanol grado MS y posteriormente disuelto en una mezcla metanol: agua 10:90. La cuantificación fue realizada mediante el programa TargetLynx de waters.

2.8 Análisis estadístico

Para generar los parámetros estadísticos, la regresión lineal y los gráficos se utilizó Microsoft Excel 2013. Las pruebas estadísticas se efectuaron usando el programa Past versión 3,15. Cuando se requirió, los resultados se compararon utilizando las medias mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, o las medianas mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis (K-W) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterización del sustrato

El sustrato contenía 86,0 % de materia orgánica con una desviación estándar de 1,4 %; 43,72 % de carbono y 1,38 % de nitrógeno con una incertidumbre de 10 %; una relación carbono/nitrógeno de 31,6 y 13,3 % de lignina insoluble en ácido con una desviación estándar de 0,8 %.

3.2 Producción de enzimas lacasa y peroxidasas

3.2.1 Actividades enzimáticas de la cepa 2922-A

La cepa 2922-A reportó actividades más altas para la enzima lacasa que las enzimas peroxidasas en todos los pHs evaluados durante todo el ensayo. Los valores de actividad enzimática obtenidos

al día 10 fueron los más altos para ambas enzimas, luego del cual la actividad disminuyó gradualmente dentro de cada grupo de pH hasta el último día de muestreo. Existió variación (K-W, $p < 0,05$) entre los tres niveles de pH para ambas enzimas. (Cuadro 1)

Para la enzima lacasa el ensayo al pH 5 reportó actividades más altas durante todo el periodo de incubación, resultando cerca de 1,4 veces más altas que las obtenidas al pH 4,5 y cerca de 17 veces más altas que las obtenidas al pH 6. Por su parte, las enzimas peroxidasas en el ensayo al pH 4,5 reportaron las actividades más altas, condición que igualmente se mantuvo durante todo el período de incubación, siendo cerca de 1,5 veces más altas que las obtenidas al pH 5 y cerca de 32 veces más altas que las obtenidas al pH 6. La actividad peroxidasas presentó una disminución clara conforme se aumentaba el pH de 4,5 a 6. (Cuadro 1)

3.2.2 Actividades enzimáticas de la cepa 2922-B

La cepa 2922-B reportó actividades enzimáticas notablemente pequeñas o nulas y poco estables en todos los días de muestreo. No se demostró variación (K-W, $p > 0,05$) entre los tres niveles de pH para ninguna de las enzimas. (Cuadro 1)

La actividad enzimática lacasa se reportó solamente en los ensayos realizados a pH 5 y 6. Para el ensayo al pH 5 la actividad más alta se obtuvo al día 10 de muestreo (1,22 U/mg de proteína), luego del cual la actividad no se detecta y vuelve a aparecer hasta el día 30. Para el ensayo al pH 6 se detecta actividad desde el día 10, disminuyendo posteriormente y reportándose luego un incremento para el día 30. Por su parte, la actividad enzimática peroxidasas se reportó en todos los pHs evaluados pero no en todos los días de muestreo. Para el ensayo al pH 4,5 la actividad se obtuvo a partir del día 10 (a excepción del día 30), mientras que para los ensayos a pH 5 y 6 fue a partir del día 25. (Cuadro 1)

Por mostrar actividades enzimáticas mayores, tanto lacasa como peroxidasas, se seleccionó la cepa 2922-A para los ensayos con herbicidas.

Cuadro 1. Actividad enzimática lacasa y peroxidasas (U/mg de proteína) presentes en el extracto enzimático de las cepas 2922-A y 2922-B cultivados en rastrojo de piña mediante fermentación sólida durante 35 días a 30 °C, sin agitación, en oscuridad.

Día	Lacasa			Peroxidasas		
	pH 4,5	pH 5	pH 6	pH 4,5	pH 5	pH 6
Cepa 2922-A						
10	91,42 (80,32-112,60) ^a	130,02 (121,63-168,30) ^{a,A}	8,82 (8,12-12,51) ^{a,A}	28,10 (23,69-37,01) ^{a,A}	15,75 (14,03-21,75) ^a	0,84 (0,76-1,20) ^{a,A}
15	51,87 (43,40-59,46) ^b	75,86 (69,97-82,53) ^{b,A}	4,83 (4,12-5,54) ^{b,A}	13,31 (11,75-14,67) ^{b,A}	10,25 (9,26-11,58) ^{b,B}	0,58 (0,54-1,14) ^{b,AB}
20	41,47 (36,57-45,88) ^c	56,58 (53,43-59,46) ^A	3,56 (3,45-3,74) ^{c,A}	12,47 (11,58-13,84) ^{c,A}	8,11 (7,88-9,17) ^c	0,26 (0,24-0,33) ^{a,A}
25	33,43 (31,15-35,33) ^a	44,08 (42,97-45,69) ^{a,A}	2,13 (1,98-2,25) ^{a,A}	8,08 (7,09-8,97) ^{a,A}	5,68 (5,42-5,88) ^a	0,28 (0,21-0,32) ^{a,A}
35	21,87 (17,84-25,29) ^{abc}	34,21 (31,66-35,13) ^{ab,A}	0,28 (0,25-0,30) ^{abc,A}	4,49 (4,06-5,49) ^{abc,A}	4,12 (3,60-4,45) ^{abc,B}	0,17 (0,15-0,19) ^{ab,AB}
Cepa 2922-B						
10	0	1,22 (1,22-3,62)	0,52 (0,38-0,88) ^a	0,12 (0,11-0,34)	0	0
15	0	0	0 ^a	0,09 (0,05-0,11)	0	0
20	0	0	0,02 (0,01-0,31)	0,08 (0,06-0,17)	0	0
25	0	0	0,1 (0,05-0,11)	0,04 (0,02-0,07)	0,04 (0,01-0,04)	0,11 (0,11-0,14)
30	0	0,02 (0,01-2,67)	0,30 (0,16-0,91)	0	0,11 (0,07-0,43)	0,07 (0,05-0,11)
35	0	0	0,11 (0,06-0,15)	0,11 (0,09-0,16)	0,06 (0,10-0,12)	0,06 (0,06-0,09)

Los valores representan la mediana de cuatro muestras para la cepa 2922-A y tres muestras para la cepa 2922-B con el rango intercuartílico. Para cada enzima letras iguales indican: (minúsculas) diferencias significativas entre días dentro de cada grupo de pH; (mayúsculas) diferencias significativas entre pHs para cada día.

3.2.3 Concentración de proteínas totales

En ambas cepas la concentración de proteínas totales aumentó a partir de la primera medición al día 10 hasta la última medición al día 35. La cepa 2922-B presentó valores más altos en comparación con la cepa 2922-A. La concentración de proteínas totales para la cepa 2922-B aumentó de 0,243 mg/mL (día 10) a 0,448 mg/mL (día 35); por su parte, para la cepa 2922-A aumentó de 0,0895 mg/mL (día 10) a 0,274 mg/mL (día 35). Teniendo en cuenta los valores reportados al día 35 para ambas cepas, se observa que la cepa 2922-B reportó una concentración casi dos veces más alta que la cepa 2922-A.

Debido al interés de observar la variación en la concentración de proteína y la actividad enzimática de la cepa 2922-A durante un periodo de fermentación más largo, el muestreo correspondiente al día 30 se trasladó al día 35.

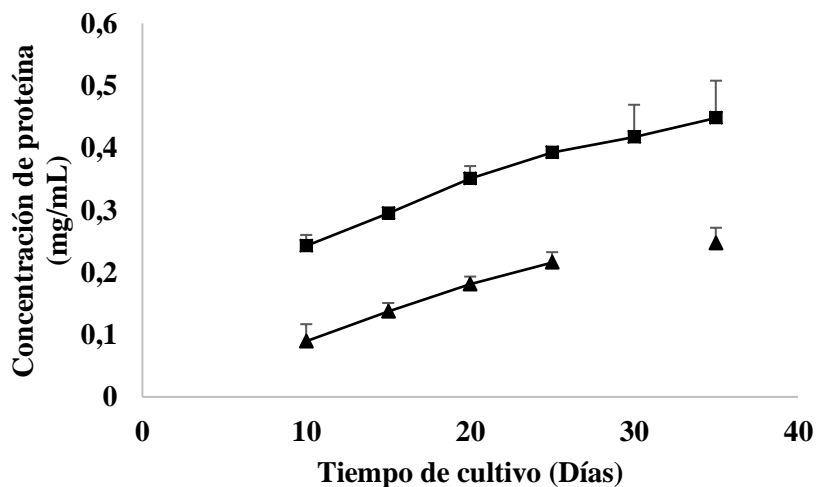


Figura 1. Concentración de proteínas totales presente en los extractos enzimáticos de las cepas 2922-A (▲) y 2922-B (■) cultivados en rastrojo de piña mediante fermentación sólida durante 35 días a 30 °C, sin agitación, en oscuridad. Los puntos representan el promedio de cuatro muestras para la cepa 2922-A y tres muestras para la cepa 2922-B. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

3.2.4 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En el gel de proteína de la cepa 2922-A, se pudo observar que todas las muestras las cuales reportaron la mayor concentración de proteína presentaron una banda de proteína con un peso molecular entre 50 y 75 kDa adyacente a la banda de proteína de la lacasa comercial del hongo *Trametes versicolor*. (Figura 2, A).

En el gel de proteína para la cepa 2922-B se observaron varias bandas de proteína por debajo de la banda de la lacasa comercial del hongo *Trametes versicolor*, con pesos moleculares inferiores al de la lacasa comercial. (Figura 2, B)

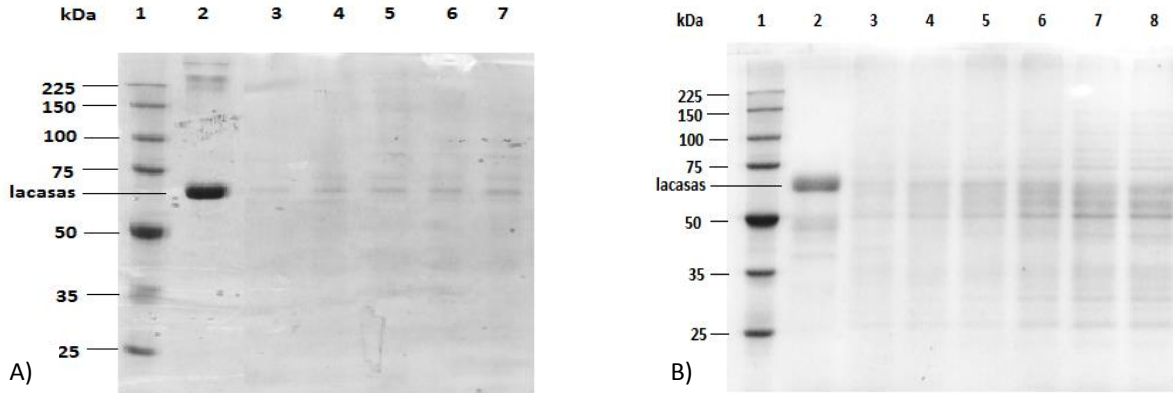


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE de proteína para el cultivo de las cepas 2922-A (A) y 2922-B (B) cultivadas en rastrojo de piña mediante fermentación sólida durante 35 días a 30 °C, sin agitación, en oscuridad. 1) Marcador de peso molecular, 2) Control positivo de lacasa comercial del hongo *Trametes versicolor*, 3-8) Muestras con la concentración de proteína más alta para los días 10, 15, 20, 25, 30 y 35.

3.3 Tolerancia de la cepa 2922-A a herbicidas

La cepa 2922-A creció en el medio suplementado con los tres herbicidas en las tres concentraciones ensayadas. El bromacil reportó las menores tasas de crecimiento en las tres concentraciones, siendo el diuron el que reportó las mayores tasas de crecimiento. Para el ensayo con diuron, al aumentar la concentración del herbicida la tasa de crecimiento igualmente aumentó.

En el control sin plaguicida y el control por solvente las tasas de crecimiento fueron $2,45 \pm 0,13$ y $5,56 \pm 0,03$ mm/día respectivamente. Comparando los medios suplementados con herbicidas con el control sin plaguicida, las tasas de crecimiento fueron entre 1,4 y 2,3 veces superior. Por su parte, en comparación con el control por solvente, únicamente en los tratamientos con diuron en las concentraciones de 20 y 30 mg/L las tasas de crecimientos fueron superiores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tasa de crecimiento de la cepa 2922-A (mm/día) en la presencia de ametrina, bromacil y diuron en tres concentraciones (mg/L), incubado durante 8 días a 30 °C, en oscuridad.

Concentración	Ametrina	Bromacil	Diuron
10	$4,86 \pm 0,07$	$3,38 \pm 0,55$	$5,17 \pm 0,13$
20	$5,34 \pm 0,17$	$4,73 \pm 0,09$	$5,58 \pm 0,03$
30	$5,41 \pm 0,01$	$4,12 \pm 0,12$	$5,72 \pm 0,03$

Los valores representan el promedio de tres muestras más la desviación estándar.

Al término del periodo de incubación ninguna concentración inhibió el desarrollo micelial de la cepa en estudio, en oposición, se reportó un desarrollo micelial mayor en los tratamientos con herbicida respecto al control sin plaguicida (Figura 3); el control por solvente (acetona) reportó igualmente un crecimiento mayor al control sin plaguicida, con un valor de 57,36%. En presencia de ametrina y diuron la cepa cubrió cada Petri totalmente en las concentraciones de 20 y 30 mg/L al día siete. El bromacil mostró un crecimiento más lento, no logrando cubrir la caja Petri en ninguna de las concentraciones ensayadas.

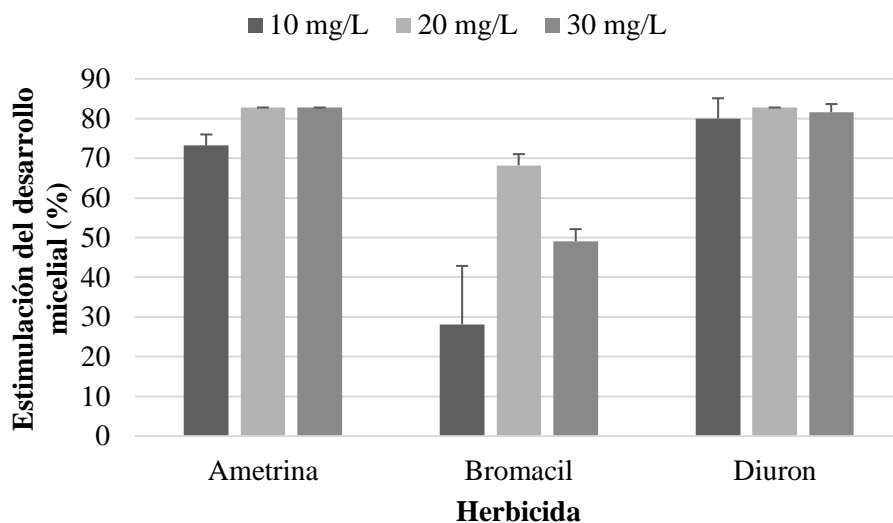


Figura 3. Porcentaje de estimulación del desarrollo micelial de la cepa 2922-A en la presencia de ametrina, bromacil y diuron en tres concentraciones, incubado durante 8 días a 30 °C, en oscuridad. Los resultados representan el promedio de tres muestras. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

Aunque la ametrina y el diuron presentaron tasas de crecimiento y desarrollo micelial similares, los ensayos de biodegradación se realizaron con diuron debido a que se observó una biomasa mayor en todas las placas Petri expuestas al herbicida.

3.4 Biodegradación de diuron

La concentración inicial de diuron en los tratamientos inoculados con la cepa 2922-A disminuyó a lo largo del periodo de fermentación (ANOVA, $p < 0,05$), alcanzando un porcentaje de remoción de 24,5 y 53,7% al día 20 y 30 respectivamente. En los tratamientos sin inóculo no se observó una disminución significativa (ANOVA, $p > 0,05$). (Cuadro 3)

La actividad enzimática lacasa y peroxidasas disminuyó a lo largo del periodo de fermentación tanto en los tratamientos adicionados con diuron (Cuadro 3), como en los tratamientos adicionados con acetona (los datos no se muestran). La actividad de cada enzima entre ambos tratamientos en los diferentes días no mostró diferencias significativas (K-W, $p > 0,05$) durante el cultivo.

Cuadro 3. Actividad enzimática (U/mg de proteína) y concentración de diuron ($\mu\text{g/g}$ rastrojo húmedo) en rastrojo de piña contaminado artificialmente con diuron e inoculado con la cepa 2922-A durante 30 días a 30 °C, sin agitación, en oscuridad.

Día	Actividad enzimática		Concentración de diuron	
	Lacasa	Peroxidasa	Tratamiento inoculado	Tratamiento sin inóculo
10	35,84 (4,72)	4,66 (0,52)	9,85 \pm 0,72 ^a	11,45 \pm 1,58
20	14,63 (0,98)	1,39 (0,22)	7,44 \pm 0,99 ^{aA}	10,30 \pm 0,93 ^A
30	1,90 (1,53)	0,20 (0,12)	4,56 \pm 1,62 ^{aB}	10,30 \pm 0,86 ^B

La cepa fue cultivada previamente 10 días en la matriz antes de la adición del diuron. Los valores representan la media de 5 muestras para la concentración de diuron más la desviación estándar; y la mediana de 3 muestras para la actividad enzimática con el rango intercuartílico. Letras iguales indican: (minúsculas) diferencias significativas dentro de cada tratamiento; (mayúsculas) diferencias significativas entre tratamientos.

4. Discusión

4.1 Producción de enzimas lacasa y peroxidasas

Los valores más altos de actividad enzimática al día 10 para la cepa 2922-A (Cuadro 1) están en concordancia con lo reportado por otros autores donde, trabajando con hongos basidiomicetos en condiciones de fermentación sólida, se alcanzaron valores máximos de actividad enzimática entre los días 10 y 20 de fermentación (Reddy, Ravindra, Komaraiah, Roy & Kothari, 2003; Arora & Sharma, 2009; Elisashvili et al., 2009).

La disminución en la actividad enzimática a partir del día 10 para ambas enzimas (Cuadro 1) pudo estar relacionada a varios factores físico-químicos. El nivel de pH durante el cultivo (no se determinó), el contenido de humedad (ajustado inicialmente a un 85%), la actividad de agua (cerca a 1) y la ausencia de aireación, pudieron variar sus condiciones a lo largo de la fermentación influenciando las actividades de cada cepa, afectando el crecimiento (García & Torres, 2003; Arora & Sharma, 2009), disminuyendo la viabilidad celular y limitando el transporte de enzimas y nutrientes (Roussos & Perraud-Gaime, 1996; García & Torres, 2003).

La composición química del sustrato y del medio de cultivo, referida como el contenido de lignina y nutrientes, pudo afectar la expresión de las enzimas. En relación al contenido de nutrientes, la limitación de nitrógeno, carbono o azufre puede favorecer la actividad ligninolítica y la producción de enzimas ligninolíticas (Heinzkill, Bench, Halkier, Schneider & Anke, 1998; Jiménez, Mejía & López, 1999; Christian, Shrivastava, Shukla, Modi & Vyas, 2005; Castillo, Torstesson & Stenstrom, 2008), sin embargo, esta condición puede variar dependiendo del hongo estudiado, ya que para el caso del nitrógeno, se ha reportado que altas concentraciones favorecen la producción de la enzima lacasa en ciertos hongos (Srinivasan, D'Souza, Boominathan & Reddy, 1995; Elisashvili et al., 2001; Galhaup, Wagner, Hinterstoisne & Haltrich, 2002; Sun et al., 2004). Para este trabajo el contenido de nitrógeno pudo estar en concentraciones limitantes (un 1,38% de nitrógeno en el rastrojo de piña, con una relación carbono nitrógeno de 31,6; y 0,1 g/L de bacto

peptona en el medio líquido GMY modificado). No obstante el contenido de carbono (43,72 % en el rastrojo de piña; 10 g de glucosa en el medio líquido GMY modificado) y azufre (no se determinó), pudieron representar concentraciones no limitantes, disminuyendo la producción de las enzimas. El contenido de lignina (13,29 %) al ser menor a lo reportado para otros sustratos (22 % en tallos de algodón, 21 % en salvado de cebada, 44 % en semillas de uva) (Kerem et al., 1992; Moldes et al., 2003), pudo no estimular el metabolismo de la cepa disminuyendo la producción de enzimas (Castillo et al., 2008).

Otro factor por considerar en la disminución en la actividad es el tiempo de la fermentación (Márquez, Mendoza, González Buntinx & Loera, 2007). Para la lacasa, existen estudios que reportan actividades desde el día 4 de cultivo, incluso actividades máximas al día 5 o 6 (Kerem, Friesem & Hadar, 1992; Moldes, Gallego, Rodríguez & Santomán, 2003; Farani de Souza, Tychanowicz, Marques de Souza & Peralta, 2006), lo cual indica que la producción de lacasa en algunos hongos ocurre durante el crecimiento micelial en la trofofase (Reddy et al., 2003; Elisashvili et al., 2009). Pero otros autores indican actividades máximas a los días 20 y 30 (Reddy et al., 2003; Arora & Sharma, 2009). Para las peroxidadas, se presenta la misma condición, pudiendo iniciar la actividad al día 5 de cultivo o alcanzar actividades máximas a los días 10 y 20 (Reddy et al., 2003; Farani de Souza et al., 2006), lo cual concuerda con que estas enzimas también son secretadas durante la idiofase por ciertos hongos (Koduri & Tien, 1995). Para esta investigación, los primeros 10 días pudieron representar el periodo de mayor producción de las enzimas, sin embargo, en ausencia de datos y al no conocer el inicio y término de las fases metabólicas en las cepas estudiadas, no es posible establecer una relación clara con la producción de enzimas.

En contraste a las condiciones discutidas, comparando la actividad enzimática con la concentración de proteínas totales (Figura 1), se puede relacionar la disminución en la actividad enzimática con el posible aumento de otras enzimas hidrolíticas como proteasas que propician la inactivación de enzimas ligninolíticas (Jiménez et al., 1999; Rodríguez, Barreiro, Rivela, Longo & Sanromán, 2002; García & Torres, 2003).

Las mediciones de actividad enzimática realizadas en los distintos niveles de pH (4,5; 5 y 6) mostraron actividades más altas en los niveles de pH 4,5 y 5, lo cual está en concordancia con lo expuesto por otros autores, donde se indica que un rango de pH ácido favorece la producción de enzimas. (Arora & Gill, 2005)

El hecho de que la cepa 2922-B reportó valores nulos de la actividad enzimática, no descarta que la cepa secrete enzimas ligninolíticas en otras condiciones de cultivo. La producción de enzimas puede variar de acuerdo al tipo de sustrato ligninolítico y según el tipo de fermentación sea sólida o líquida, influyendo en la composición química, contenido de humedad y fenómenos de superficie (Vares, Kalsi & Katakka, 1995; Heinzkill et al., 1998; Elisashvili et al., 2001; Mikiashvili, Wasser, Nevo & Elisashvili, 2006; Elisashvili et al., 2009). Podría considerarse también que la especie a la cual pertenece la cepa no secrete enzimas ligninolíticas, reportando entonces actividad enzimática nula, sin embargo, que una cepa no secrete una o varias enzimas ligninolíticas no se relaciona directamente con que la especie a la cual pertenece presente la misma condición. (Hammel 1996; Domínguez et al., 2011; Yang et al., 2013)

Los pesos moleculares de las bandas de lacasas observadas (Figura 2) se encontraron dentro del rango reportado para las lacasas típicas, las cuales se encuentran entre los 60 y 80 kDa (Thurston, 1994; Heinzkill et al., 1998; Román et al., 2010). Para la cepa 2922-B, las bandas observadas pueden corresponder a distintas isoformas de la enzima lacasa (Heinzkill et al., 1998). Es conveniente mencionar que las muestras (3-8, Figura 2) no se normalizaron a una concentración conocida previo a ser cargadas a cada pozo del gel, por lo que el aumento en la intensidad de las bandas visualizadas no corresponde específicamente a un aumento en la concentración de lacasa.

4.2. Tolerancia de la cepa 2922-A a herbicidas

La cepa 2922-A mostró ser tolerante a los herbicidas ensayados. Las tasas de crecimiento (Cuadro 2) pueden considerarse óptimas. Estudios realizados con el hongo *T. versicolor* expuesto a los herbicidas trifluralina y zimazina, han reportado tasas máximas de 2,0 mm/día utilizando concentraciones máximas de 10 mg/L a 15 °C (Fragoero, 2005). Por otra parte, la estimulación en el crecimiento de la cepa en los tratamientos con herbicida (Figura 3) y acetona, se contraponen a lo observado por Fragoero (2005), donde se reportaron porcentajes de inhibición entre 1 y 93% utilizando herbicidas en concentraciones de 20 mg/L. El crecimiento observado en este trabajo (Figura 3) sugiere que la cepa utilizó las sustancias como fuente de energía. Al respecto, Stamatiu et al. (2015) determinaron que algunas cepas de hongos filamentosos utilizaron acetona como fuente de carbono; asimismo, reportó que los insecticidas clorpirifos y endosulfan pudieron haber estimulado el crecimiento.

4.3. Biodegradación de diuron

La adsorción y biotransformación son los principales mecanismos de degradación de plaguicidas en matrices orgánicas inoculadas con microorganismos (Masaphy et al., 1996), en el caso del diuron, la forma dominante de su degradación es mediante biodegradación (Giacomazzi & Cochet, 2004). Ante lo anterior, la disminución de la concentración del herbicida observada a lo largo del ensayo (Cuadro 3) se atribuye a la presencia de la cepa 2922-A. Los resultados corresponden con otros estudios donde se reportan porcentajes de remoción de diuron entre 0,6 y 99,4% en matrices sólidas (Fratila, Hirst, Siebel & Gijzen, 1999; Bending et al., 2002).

En nuestra investigación, no es posible atribuir la disminución del diuron a la actividad enzimática debido a que ésta última igualmente disminuyó durante la fermentación. Esta condición varía según el hongo y la matriz utilizada. Fratila et al (1999) reporta un aumento en la producción de la enzima manganeso peroxidasa y la disminución del diuron sobre ceniza de madera; mientras que Bending et al. (2002) no encontró relación entre una prueba presuntiva de actividad ligninolítica y la degradación del diuron en una biocama compuesta de paja de cebada, suelo y compost. En ausencia de una relación clara entre la actividad enzimática ligninolítica y la degradación de xenobióticos, otros procesos cometabólicos o sistemas enzimáticos, como las monooxigenasas P450, podrían estar involucrados (Castillo, Felis, Arago, Cuesta & Sabater, 2006; Subramanian & Yavad, 2009; Ellegaard, Aamand, Kragelund, Johnsen & Rosendahl, 2013).

Pudo existir una posible adsorción del diuron en el micelio fúngico. Al día de adición de diuron (día 10 de cultivo), el rastrojo de piña estaba cubierto por micelio, el cual pudo adsorber un porcentaje de la concentración inicial. Sin embargo, en nuestro análisis, el método de extracción

de QhEChERS no separa el rastrojo de piña del micelio, por lo cual no es posible esclarecer qué fracción del porcentaje de remoción de plaguicida fue debido a este factor. En ensayos de degradación de diuron en fermentaciones líquidas se ha reportado adsorción en el micelio fúngico (da Silva, de Oliveira, Marques de Souza, Bracht & Peralta, 2010). En matrices sólidas este factor ha contribuido a la degradación de herbicidas como la atrazina (Masaphy et al., 1996).

Tomando en cuenta que en los tratamientos sin inóculo no se demostró una disminución significativa en la concentración inicial de diuron (Cuadro 3), se considera que no hubo influencia de factores abióticos u otros mecanismos de degradación.

5. Conclusiones

Se comprobó que ambas cepas de hongos pueden producir enzimas con capacidad lignocelulolítica en fermentación sólida con rastrojo de piña, aunque con amplia diferencia en la magnitud de la actividad. Se mostró además la capacidad de la cepa 2922-A para crecer en la presencia de herbicidas, evidenciando luego el potencial de la cepa 2922-A para biodegradar diuron. La capacidad para degradar diuron por parte de la cepa, indica que ésta podría ser utilizada como herramienta en procesos de biorremediación de este tipo de contaminantes. El realizar estudios de caracterización de la actividad enzimática en distintas condiciones, en simultáneo con la biodegradación de plaguicidas de uso agroindustrial, son cruciales para la exploración de los alcances del uso de microorganismos como alternativas de biorremediación y constituyen un valioso aporte a los estudios de bioprospección realizados en Costa Rica. La selección del sustrato adecuado así como la cepa empleada, permitirán a futuro optimizar este tipo de cultivos y escalar el proceso a volúmenes mayores para su aplicación en campo y/o la formulación de un producto enzimático.

6. Agradecimientos

Los investigadores agradecen al INBio, ACOSA y al CONAGEBIO por facilitar el uso de las cepas (Segundo Adendum al CPI entre INBio y ACOSA bajo el permiso No. Res-R-CM-INBio-040-2008). Se agradece a la Ing. Iray Mata y a todo el personal del CENIBiot-CENAT por la guía, apoyo y uso de instalaciones durante todo el proceso; de igual forma al LAREP IRET-UNA. También se agradece la lectura del documento al M.Sc Manfred Murrell Blanco. Este proyecto contó con financiamiento al Sr. Calderón Tenorio a través del Programa de Becas CENAT-CONARE.

7. Referencias

- Ali, M., Khalil, N., & Abd El Ghany, M. (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(16), 3783–3790.
- Arias-Andrés, M; & Vázquez Duhalt, R. 2013. Búsqueda y caracterización de peroxidasas de origen microbiano para la biorremediación de contaminantes acuáticos. Informe de pasantía Proyecto Intercambio Académico ANUIES-CSUCA, Convocatoria 2012.

- Arias-Andrés, M., Mena Torres, F., Ugalde, R., Grandas, L., Ruepert, C., Castillo, L., Gunnarsson, J. (2016). Lower tier toxicity risk assessment of agriculture pesticides detected on the Río Madre de Dios watershed, Costa Rica. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-016-7875-7
- Arora, D. S., & Gill, P. K. (2005). Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1021–1028. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-7655-2>
- Arora, D. S., & Sharma, R. K. (2009). Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18, 151–161.
- Arora, D. S., & Sharma, R. K. (2011). Effect of different supplements on bioprocessing of wheat straw by *Phlebia brevispora*: Changes in its chemical composition, in vitro digestibility and nutritional properties. *Bioresource Technology*, 102, 8085–8091.
- Bending, G. D., Friloux, M., & Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212, 59–63.
- Castillo, M. A., Felis, N., Arago, P., Cuesta, G., & Sabater, C. (2006). Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58, 196–202.
- Castillo, M. del P., Torstensson, L., & Stenstrom, J. (2008). Biobeds for environmental protection from pesticide use: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6206–6219.
- Chen, B., Wang, Y., & Hu, D. (2010). Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials*, 179, 845–851.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H. A., & Vyas, B. R. M. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 301–312.
- Coto Chinchilla, O. (2013). *Prácticas actuales de tratamiento y disposición de los residuos agrícolas orgánicos en Costa Rica*. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/proyectos/proy-residuos-agricolas-org/productos/Informe%20RAO%20CR%20Producto%202.pdf>
- da Silva Coelho, J., de Oliveira, A. L., Marques de Souza, C. G., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2010). Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64, 156–161.

- Fratila Apachitei, L. E., Hirst, J. A., Siebel, M. A., & Gijzen, H. J. (1999). Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media. *Biotechnology Letters*, *21*, 147–154.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., & Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*, 529–536.
- García Torres, A. M., & Torres Sáe, R. G. (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *5*(1), 56–64.
- Giacomazzi, S., & Cochet, N. (2004). Environmental impact of diuron transformation : a review. *Chemosphere*, *56*, 1021–1032. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.061>
- Gomes, E., Aguiar, A. P., Carvalho, C. C., Bonfá, M. R. B., da Silva, R., & Boscolo, M. (2009). Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*, 31–39.
- Hammel, K. (1996). Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New Journal of Chemistry*, *20*, 195–198.
- Han, M.-J., Choi, H.-T., & Song, H.-G. (2004). Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Microbiology*, *42*(2), 94–98.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., & Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(5), 1601–1606.
- Heyse Niebisch, C., Knoll Malinowski, A., Schadeck, R., Mitchell, D. A., Kava Cordeiro, V., & Paba, J. (2010). Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. *Journal of Hazardous Materials*, *180*, 316–322.
- Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio). (2013). San José, Costa Rica. Recuperado de http://www.inbio.ac.cr/es/biod/bio_biodiver.htm
- Jiménez, G., Mejía, A., & López, B. (1999). Actividad de las enzimas ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn²⁺. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*. *23*(89), 587-593
- Kerem, Z., Friesem, D., & Hadar, Y. (1992). Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium* Lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(4), 1121–1127.

- Koduri, R., & Tien, M. (1995). Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(38), 22254–22258.
- Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP). 2016. Extracción de plaguicidas en hortalizas usando el método de QuEChERS modificado con acetato de etilo.
- López Herrera, M., WingChing Jones, R., & Rojas Bourrillón, A. (2009). Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas comosus*). *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 1–15.
- López Herrera, M., WingChing Jones, R., & Rojas Bourrillón, A. (2014). Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas comosus*) para la alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 383–392.
- Ministerio del Ambiente, Energía y Telecomunicaciones, Ministerio de Agricultura y Ganadería, & Programa de Desarrollo. Agroindustrial. (2009). *Evaluación del impacto ambiental generado por la eliminación del rastrojo de piña a través de su incorporación al suelo*. Recuperado de cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/.../protocolo-rastrojo.pdf
- Maqbool, Z., Hussain, S., Imran, M., Mahmood, F., Shahzad, T., Ahmed, Z., ... Muzammil, S. (2016). Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 16904–16925.
- Márquez Araque, A. T., Mendoza Martínez, G. D., González Muñoz, S. S., Buntinx Dios, S. E., & Loera Corral, O. (2007). Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia*, 32(11), 780–785.
- Masaphy, S., Levanon, D., & Henis, Y. (1996). Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 56, 207–214.
- Mikiashvili, N., Wasser, S. P., Nevo, E., & Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 999–1002.
- Moldes, D., Gallego, P. P., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 25, 491–495.
- Pinto, A. P., Serrano, C., Pires, T., Mestrinho, E., Dias, L., Teixeira, D. M., & Caldeira, A. T. (2012). Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of the Total Environment*, 435–436, 402–410.

- Quesada Solís, K., Alvarado Aguilar, P., Sibaja Ballester, R., & Vega Baudrit, J. (2005). Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 6(2), 157–179.
- Quintero, J., Feijoo, G., & Lema, J. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *VITAE*, 13(2), 61–67.
- Quintero Diaz, J. C. (2011). Revisión: degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64(1), 5867–5882.
- Reddy, G. V., Ravindra Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., & Kothari, I. L. (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, 38, 1457–1462.
- Rodríguez Couto, S., Barreiro, M., Rivela, I., Longo, M. A., & Sanromán, Á. (2002). Performance of a solid-state immersion bioreactor for ligninolytic enzyme production: Evaluation of different operational variables. *Process Biochemistry*, 38(2), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00083-3)
- Rojas Fonseca, D. (2016). *Evaluación in vitro de un consorcio de hongo y bacterias sobre la degradación del rastrojo de piña* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.
- Rojas Jiménez, K., & Hernández, M. (2015). Isolation of fungi and bacteria associated with the guts of tropical wood-feeding coleoptera and determination of their lignocellulolytic activities. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1–11.
- Román, R., Torres Duarte, C., Ayala, M., & Vázquez Duhalt, R. (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Corioloopsis gallica*. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 19–27.
- Roussos, S., & Perraud-Gaime, I. (1996). Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. *Fronteras En Biotecnología Y Bioingeniería*, 341–348.
- Saftić-Pankovic, D., Veljovic Jovanovic, S., Pucarevic, M., Radovanovic, N., & Mijic, A. (2006). Phenolic compounds and peroxidases in sunflower near-isogenic lines after downy mildew infection. *Helia*, 29(45), 33–42.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185–194.
- Srinivasan, C., D'Souza, T., Boominathan, K., & Reddy, C. (1995). Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4274–4277.

- Stamatiu Sánchez, K., Alarcón, A., Ferrera Cerrato, R., Nava Díaz, C., Sánchez Escudero, J., Cruz Sánchez, J. S., & Castillo, M. del P. (2015). Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(1), 23–37.
- Subramanian, V., & Yadav, J. S. (2009). Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5570–5580.
- Sun, X., Zhang, R., & Zhang, Y. (2004). Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *Journal of Basic Microbiology*, 44(3), 220–231.
- Thurston, C. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.
- Tran, N. H., Urase, T., & Kusakabe, O. (2010). Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Water and Environment Technology*, 8(2), 125–140.
- Vares, T., Kalsi, M., & Hatakka, A. (1995). Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid state fermentation of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3515–3520.
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Price, W. E., Roddick, F., Moreira, M. T., & Magram, S. F. (2013). Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review. *Bioresource Technology*, 141, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.173>
- Zeddel, A., Majcherczyk, A., & Hüttermann, A. (1993). Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *pleurotus ostreatus* and *trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 40, 255–266.