



IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS CRECIDOS SOBRE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE DI (2-ETILHEXIL) FTALATO PROVENIENTES DE UNA INDUSTRIA PRODUCTORA DE PAPEL

José Luis Torres³, Omar Torres-Tovar², Ma. del Rosario Báez-Sánchez⁵, Daniel Claudio Martínez-Carrera⁴, Miriam Ahuactzin-Pérez³, Carmen Sánchez¹

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala C.P. 90062, México; ²Licenciatura en biología, UAT; ³Facultad de Agrobiología, UAT; ⁴Colegio de postgraduados, Puebla, México.

⁵Universidad Politécnica de Tlaxcala Región Poniente. Recova, Hueyotlipan, Tlaxcala, C.P. 90240, México. *Autor para correspondencia: Tel/fax: +522484815482. Email:sanher6@hotmail.com

Palabras clave: Identificación molecular, Di (2-etilhexil) ftalato, hongos filamentosos.

Introducción. Los esteres de ftalato son liberados frecuentemente por industrias productoras de plástico y papel durante sus procesos de manufactura, produciendo daños al ambiente y ecosistemas (1). El di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es uno de los plastificantes más empleados en todo el mundo además presenta diversos efectos toxicológicos en humanos y algunas especies de animales (2). Sin embargo existe un gran número de microorganismos que tienen la capacidad de biodegradar estos compuestos por su eficiente sistema enzimático extracelular (3).

En este trabajo se aislaron e identificaron molecularmente hongos filamentosos provenientes de una industria productora de papel, los cuales fueron crecidos sobre agar conteniendo diferentes concentraciones de DEHF, determinando las actividades extracelulares de lacasas y esterasas.

Metodología. Las muestras fueron tomadas de diferentes etapas del proceso de reciclado (Tabla 1). La identificación molecular se realizó como se reportó previamente (4). Los productos de la PCR fueron secuenciados por Seq Wright DNA Technology Services (U.S.A.) y se comparó el porcentaje de homología utilizando la base de datos de la NCBA. Se crecieron las cepas de hongos en distintos medios de cultivo sólido conteniendo sales minerales más 20 g/L de agar bacteriológico y diferentes concentraciones de DEHF (500, 750, 1000, 1200 y 1500 mg/L). Se ajustó el pH a 6.0 utilizando NaOH 1M. El DEHF fue añadido y zonificado por 3 min empleando un Sonicador (GEX 130). Se obtuvo el extracto enzimático extracelular (EEE) separando el micelio del medio de cultivo y añadiendo 25 ml de agua a las cajas petri, manteniéndolas a 4°C durante 24h, posteriormente se obtuvieron 5 ml de EEE para realizar la actividad enzimática de lacasas y esterasas. La actividad de lacasas y esterasas se realizó utilizando 2,6 dimetoxifenol y p-nitrofenil butirato como sustratos, la absorbancia se leyó a 468 nm y 405 nm, respectivamente.

Resultados. En la Tabla 1 se muestran los nombres científicos de las cepas identificadas así como el porcentaje de homología y los números de acceso del NCBA. Con respecto a la actividad enzimática extracelular de lacasas *Neurospora sitophila* mostró la mayor actividad en el medio conteniendo 500 mg de DEHF/L seguido por *Trichoderma atroviride* en el medio

de 1500 mg de DEHF/L. *F. culmorum* y *T. harzianum* mostraron mayor actividad de esterasas que actividad de lacasas en todos los medios estudiados (Tablas 3 y 4).

Tabla 1. Identificación molecular de los hongos aislados de diferentes etapas del proceso de reciclado de una industria recicladora de papel

Etapas del proceso de reciclado de papel	Nombre científico	% de homología	Numero de acceso
Pulpeo	<i>Neurospora sitophila</i> (Shear and B.O. Dodge)	99%	HF947519
Pulpeo	<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Sm. Sacc.)	91%	HF947520
Material con biocida	<i>Trichoderma atroviride</i> (P. Karst)	100%	HF947518
Aguas residuales	<i>Hypocrea lixii</i> (Pat)	97%	HF947522
Aguas residuales	<i>Trichoderma harzianum</i> (Rifai)	100%	HF947517

Tabla 2. Actividad extracelular de lacasas (U/L) de los hongos filamentosos aislados de una industria recicladora de papel

Cepa	Concentración de DEHF (mg/l)					
	0	500	750	1000	1200	1500
<i>Neurospora sitophila</i>	8.3 ^a (0.03)	33.9 ^b (0.16)	12.3 ^d (0.009)	9.3 ^c (0.05)	18.6 ^c (0.06)	23.1 ^b (0.03)
<i>Fusarium culmorum</i>	7.8 ^a (0.001)	11.6 ^d (0.03)	12.4 ^c (0.03)	15.3 ^b (0.02)	8.8 ^a (0.01)	17 ^a (0.02)
<i>Trichoderma atroviride</i>	4.4 ^d (0.05)	24.4 ^b (0.05)	5.5 ^e (0.01)	5.1 ^c (0.01)	5.1 ^c (0.01)	27.1 ^a (0.001)
<i>Hypocrea lixii</i>	7.1 ^d (0.02)	11.1 ^c (0.02)	5 ^e (0.01)	7.2 ^d (0.01)	21.4 ^a (0.05)	16.1 ^b (0.03)
<i>Trichoderma harzianum</i>	8.7 ^c (0.02)	8.04 ^e (0.03)	2 ^e (0.01)	7.1 ^d (0.04)	18.1 ^b (0.06)	22.3 ^a (0.01)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes (p<0.05)

Tabla 3. Actividad extracelular de esterasas (U/L) de los hongos filamentosos aislados de una industria recicladora de papel

Cepa	Concentración de DEHF (mg/l)					
	0	500	750	1000	1200	1500
<i>Neurospora sitophila</i>	11.3 ^d (0.05)	22.7 ^c (0.05)	6.5 ^b (0.01)	22.1 ^c (0.07)	38.3 ^a (0.16)	34.1 ^b (0.12)
<i>Fusarium culmorum</i>	14.8 ^d (0.03)	69.4 ^a (0.08)	63.3 ^c (0.16)	40.3 ^b (0.009)	20.5 ^d (0.02)	55.3 ^a (0.04)
<i>Trichoderma atroviride</i>	5.7 ^e (0.04)	3.6 ^d (0.02)	19.5 ^b (0.12)	3.11 ^e (0.009)	21 ^b (0.12)	27.1 ^a (0.18)
<i>Hypocrea lixii</i>	7.1 ^d (0.02)	12 ^c (0.01)	22.3 ^a (0.13)	7.4 ^d (0.003)	18.4 ^b (0.02)	18 ^b (0.006)
<i>Trichoderma harzianum</i>	39.7 ^a (0.11)	225.7 ^a (0.14)	79.4 ^b (0.09)	95.5 ^d (0.15)	122.1 ^b (0.31)	111.2 ^c (0.30)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes (p<0.05)

Conclusiones.

Los hongos *N. sitophila*, *F. culmorum*, *T. atroviride*, *H. lixii*, *T. harzianum* fueron aislados e identificados. Estas cepas podrían ser empleadas para biorremediación de lugares contaminados con DEHF.

Bibliografía.

- Ahuactzin-Pérez M, Torres JL, Madrid-Ramírez A, Godínez G, Sánchez C. (2012). Evaluación del crecimiento sobre dibutil ftalato de cepas de hongos aislados del proceso de reciclado de una industria productora de papel. *V Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental (AMEQA) y SETAC-México*. Aguascalientes. Aguascalientes, Marzo.
- Vats S, Singh RK, Tyagi P. (2013). Phthalates - a priority pollutant. *Int. J. Adv. Biol. Res.* 3: 1-8.
- Zhu-Hua L, Ka-Lai P, Yi-Riu W, Ji-Dong G, Chow R, Vrijmoed LP. (2012). Degradation of phthalate esters by *Fusarium* sp. DMT-5-3 and *Trichosporon* sp. DMI-5-1 isolated from mangrove sediments. *Mol. Subcell. Biol.* 53: 299-328.
- Challen MP, Moore AJ, Martínez-Carrera D. (1995). Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *BioTechniques*.18: 7-8.