

EFFECTO DE RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO SOBRE HONGOS LIGNINOLÍTICOS

Spinosa, M.¹, Grassi, E.², Itria, R.², Levin, L.², Pizarro, R.¹

¹Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN)

mspinosa@cae.cnea.gov.ar

Las resinas de intercambio iónico son utilizadas para la purificación de aguas en diferentes procesos como la producción de alimentos, medicamentos, bebidas, así como también en los reactores nucleares y de investigación para remover los nucleídos presentes en el sistema. La biodegradación de las resinas de intercambio iónico agotadas provenientes del área nuclear, es una potencial alternativa para el tratamiento y la disminución del volumen de estos residuos radiactivos, como la incineración, pirolisis y otros. Los hongos ligninolíticos poseen una batería enzimática extracelular, inespecífica y con alto potencial redox, que les permite degradar eficientemente a la lignina y a numerosos compuestos recalcitrantes de naturaleza aromática semejantes. Las principales enzimas que están involucradas en este proceso son la lignin-peroxidasa, Mn-peroxidasa y lacasa. Las resinas de intercambio iónico extremadamente recalcitrantes tienen una estructura molecular semejante a la lignina. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de hongos ligninolíticos sobre las resinas de intercambio iónico. Las especies estudiadas fueron *Trametes trogii* BAFC 463, *Trametes versicolor* BAFC 2234, *Fomes fasciatus*, *Ganoderma lucidum* E47 y dos cepas de *Pestalotiopsis güepinii* BAFC 4311 y BAFC 4314. En la primera etapa se evaluó el crecimiento de cada uno de estos hongos ante la presencia de resinas de intercambio iónico mixtas y aniónicas en medio - agar-agua con el agregado de glucosa 5% como fuente de carbono o sin fuente de carbono adicional. A través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se pudo observar que *T. trogii* BAFC 463 y *T. versicolor* BAFC 2234 fueron los que presentaron un potencial efecto sobre las resinas de intercambio iónico y específicamente sobre las resinas aniónicas. Posteriormente *T. trogii* y *T. versicolor* fueron cultivados en medio de cultivo agarizado rico en nutrientes en presencia de resinas de intercambio iónico aniónicas y catiónicas evaluándose la velocidad de crecimiento radial. Por último se los cultivó en medio líquido sintético con glucosa y asparagina como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente y con la adición de resina aniónica o catiónica, determinándose la actividad ligninolítica lacasa a diferentes tiempos y la concentración de cobre en el medio de cultivo. En los cultivos de ambos hongos con resina aniónica se observó un retardo en el crecimiento de la colonia, aunque la concentración de cobre se mantuvo constante en el sobrenadante de cultivo. En el caso de los cultivos con resina catiónica, no se observó crecimiento y la concentración de cobre disminuyó considerablemente. En conclusión, *T. trogii* y *T. versicolor* fueron capaces de crecer en presencia de resina aniónica y no así en presencia de resina catiónica. Esta última produjo una inhibición en el desarrollo fúngico relacionado con la disminución en la disponibilidad de cobre u otros micronutrientes no evaluados en el ensayo, necesarios para su crecimiento y presentes en el medio de cultivo, por intercambio catiónico con la resina.

EFFECT OF ION EXCHANGE RESINS ON LIGNINOLYTIC FUNGI

Spinosa, M.¹, Grassi, E.², Itria, R.², Levin, L.², Pizarro, R.¹

¹Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN)

mspinosa@cae.cnea.gov.ar

Ion exchange resins are used for water purification in a variety of processes as food industry, medicine and beverages as well as in nuclear and research reactors to remove nuclides present in the system. Biodegradation of spent ion exchange resin coming from the nuclear area is a potential alternative for treatment and volume reduction of this radioactive waste, as the incineration, pyrolysis and others. Ligninolytic fungi secrete several unspecific and high redox potential enzymes that allow them to degrade lignin and other recalcitrant compounds with similar aromatic nature. The main enzymes involved in this process are lignin-peroxidase, Mn-peroxidase and laccase. The molecular structure of ion exchange resin resembles that of lignin and is extremely recalcitrant as well. The main objective of this work was to evaluate the effect of ligninolytic fungi on ion exchange resin. The studied strains were *Trametes trogii* BAFC 463, *Trametes versicolor* BAFC 2234, *Fomes fasciatus*, *Ganoderma lucidum* E47 and *Pestalotiopsis güepinii* BAFC 4311 and BAFC 4314. First, the growth of these fungi in the presence of mixed and anionic ion exchange resin in agar plates with 5% of glucose as carbon source or without any additional carbon source, was evaluated. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed that anionic ion exchange resins were modified by *T. trogii* BAFC 463 and *T. versicolor* BAFC 2234. Then, *T. trogii* and *T. versicolor* were grown in plates of a synthetic medium with glucose and asparagine as carbon and nitrogen sources, respectively, supplemented with cationic and anionic ion exchange resins. Radial growth plate was evaluated. Finally, each strain was grown on glucose/asparagine liquid culture. Cationic and anionic ion exchange resins were included to evaluate laccase production and copper concentration in the culture medium. In both strains evaluated a delay in growth was registered with the anionic resin, and copper concentration remained constant in the culture supernatants. With the cationic resin the fungi assayed couldn't growth and a very low concentration of copper was observed in both fungal cultures. In conclusion, *T. trogii* and *T. versicolor*, were able to growth under the presence of the anionic resin but not with the cationic one. The last one inhibited their growth probably due to low availability of copper and other nutrients not evaluated, that were interchanged with the resin.

INTRODUCCIÓN

Las resinas de intercambio iónico orgánicas son utilizadas en los reactores nucleares de potencia e investigación para remover sustancias químicas que podrían perjudicar su funcionamiento. Una vez agotadas, dichas resinas son tratadas como residuo radiactivo. Se conocen diferentes tratamientos y formas de acondicionar las resinas una vez que se recambian de los reactores y disponen como residuo radiactivo. Algunas de ellas están relacionadas con la destrucción o disminución del volumen de las mismas ya sea por procesos físicos o químicos y otras con su inmovilización. Algunos ejemplos son la incineración, pirolisis, cementación, vitrificación, oxidación húmeda, entre otros. Otra técnica de tratamiento es la degradación microbiana (biodegradación), que al momento no ha sido muy estudiada.

Las resinas utilizadas en estos reactores son resinas comerciales catiónicas, aniónicas y de lecho mixto. Tienen una estructura molecular de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno (PS-DVB) y grupos funcionales fijados a la misma que le permiten llevar a cabo la función de intercambio de iones. Las resinas catiónicas poseen grupos funcionales sulfónicos unido a la matriz polimérica y las aniónicas grupos amino cuaternario. Las resinas mixtas son mezcla de ambos tipos.

Los hongos causantes de pudrición blanca conforman un grupo fisiológico cuya característica es su capacidad de degradar todos los componentes de la madera. Pueden llevar a cabo este proceso porque poseen los grupos de enzimas necesarias para la ruptura de todos los polímeros que conforman los tejidos vegetales: celulasas, hemicelulasas, pectinasas y ligninasas..

Las ligninasas son enzimas extracelulares que por su alto poder oxidativo y baja especificidad pueden ser utilizadas en diversos procesos biotecnológicos, como por ejemplo bioconversión de alimentos (Ruqayyah et al., 2014), producción de bioetanol de segunda generación (Hori and Cullen, 2016) y en biopulpado y bioblanqueo de pulpa de papel (Kaur et al., 2016). Estas enzimas son capaces de catalizar la oxidación de diversos compuestos similares estructuralmente a la lignina, muchos de ellos contaminantes orgánicos ambientales algunos altamente tóxicos o cancerígenos y de prolongada persistencia en el medio ambiente, como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y colorantes (Rao et al., 2014; Kües, 2015). Entre las enzimas que intervienen en el proceso de degradación de lignina, se destaca por su amplia distribución la polifenoloxidasas lacasa (EC 1.10.3.2).

Los basidiomycota son los organismos que han sido más estudiados en lo que respecta a esta enzima debido a los altos niveles de producción en cultivo, algunos ejemplos son *Pleurotus ostreatus* (Hou et al., 2004); *Ganoderma adspersum* (Songulashvili et al., 2006), *Pycnoporus sanguineus* (Pointing and Vrijmoed, 2000) y *Trametes trogii* (Grassi et al., 2011).

Las resinas de intercambio iónico extremadamente recalcitrantes tienen una estructura molecular semejante a la lignina. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción entre hongos ligninolíticos y las resinas de intercambio iónico, con miras a su aplicación en procesos de degradación microbiana de resinas ya agotadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de hongos cultivadas

Las especies cultivadas fueron *Trametes trogii* BAFC 463, *Trametes versicolor* BAFC 2234, *Fomes fasciatus*, *Ganoderma lucidum* E47 y dos cepas de *Pestalotiopsis güepinii* BAFC 4311 y BAFC 4314.

Medios de cultivo

Extracto de Malta: las especies mencionadas se cultivaron en un medio de cultivo natural conteniendo 12,7 g de extracto de malta, 10 g de glucosa y 20 g de agar en 1L de agua destilada. El medio de cultivo luego de ser autoclavado para su esterilización a 121°C durante 20 minutos, se distribuyó en placas de Petri estériles de 10 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio, las diferentes especies de hongos fueron cultivadas en dicho medio a 28 ± 1 °C durante 6 a 8 días según la especie. Este medio es utilizado para mantener el stock de cultivos.

Las especies provenientes del medio de cultivo extracto de malta, fueron cultivadas en agar agua (20 g de agar en 1L) y agar agua con 5% de glucosa en presencia de resina de intercambio iónico aniónicas y mixtas, separadamente. Las condiciones de incubación fueron a una temperatura de 28 ± 1 °C durante 30 días aproximadamente.

Glucosa . Asparagina: 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g H_2KPO_4 ; 0,6 g HK_2PO_4 ; 0,4 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,09 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,07 mg H_3BO_3 ; 0,02 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 2,5 $ZnCl_2$; 1 mg $FeCl_3$; 0,1 mg tiamina; 0,005 mg biotina, 10 g de glucosa, 4 g de asparagina en 1L de agua destilada con 20 g de agar para el caso del medio agarizado o sin este para el cultivo líquido, con un pH final de 6,5. Luego de ser esterilizado en autoclave y enfriado a una temperatura de 45 °C, fue suplementado con una solución de $CuSO_4$, autoclavada separadamente, para alcanzar una concentración final de 1mM. El medio sólido se distribuyó en placas de Petri de 10 cm de diámetro y el medio líquido en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml del medio.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las especies *T. trogii* BAFC 463, *T. versicolor* BAFC 2234, *F. fasciatus*, *G. lucidum* E47 y dos cepas de *P. güepinii* BAFC 4311 y BAFC 4314 cultivadas en medio de cultivo Agar-Agua en presencia de resina aniónica fueron observadas en Microscopio Electrónico de Barrido SEM FEI QUANTA 200.

Crecimiento radial

Se sembró 0,25 cm² del micelio de las especies *T. trogii* y *T. versicolor* en medio sólido Glucosa - Asparagina en presencia de resinas de intercambio iónico aniónicas y catiónicas evaluándose la velocidad de crecimiento radial. Las condiciones de incubación fueron 28 ± 1 °C durante 12 días aproximadamente.

Actividad enzimática de enzima lacasa

Las mismas especies, *T. trogii* y *T. versicolor*, fueron cultivadas en presencia de 1g de resina aniónica y catiónica en medio líquido Glucosa - Asparagina durante 28 días a 28 ± 1 °C y agitación de 110 rpm. También se realizaron cultivos control de los hongos sin resinas, cultivados en las mismas condiciones. Se determinó la actividad enzimática a diferentes tiempos en días t=0, t=7, t=21 y t=28. Se midió la actividad lacasa por oxidación del dimetoxifenol (DMP) 5 mM en buffer acetato de sodio de pH 3,6. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y el producto se valoró espectrofotométricamente a 469 nm con un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{469}=27,5$ mM.cm. Una unidad de actividad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de sustrato en 1 min.

Determinación analítica de cobre

Se determinó la concentración de cobre al comienzo y final de la incubación de *T. versicolor* cultivado con resina aniónica, catiónica y muestras control (sin resina) en medio Glucosa . Asparagina en erlenmeyers de 250 ml. La determinación se realizó con PicoFox marca Bruker . Modelo S2 TXRF

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

T. trogii, *T. versicolor*, *F. fasciatus*, *G. lucidum* y *P. güepinii*, cultivados en medio de cultivo Agar-Agua en presencia de resina mixta, tanto con el agregado de glucosa 5% como sin esta, no produjeron ninguna modificación macroscópica de la resina.

Estas mismas especies, cultivadas en las mismas condiciones pero con resina aniónica sí produjeron un oscurecimiento de las resinas tanto las cultivadas con agregado de glucosa 5% como sin esta. El efecto se observó principalmente sobre las resinas aniónicas cultivadas con *T. trogii* y *T. versicolor*. Figura 1.

En esta primera etapa se evaluó el potencial uso de las resinas como fuente de carbono y el grupo funcional amino cuaternario de la resina aniónica como fuente de nitrógeno.

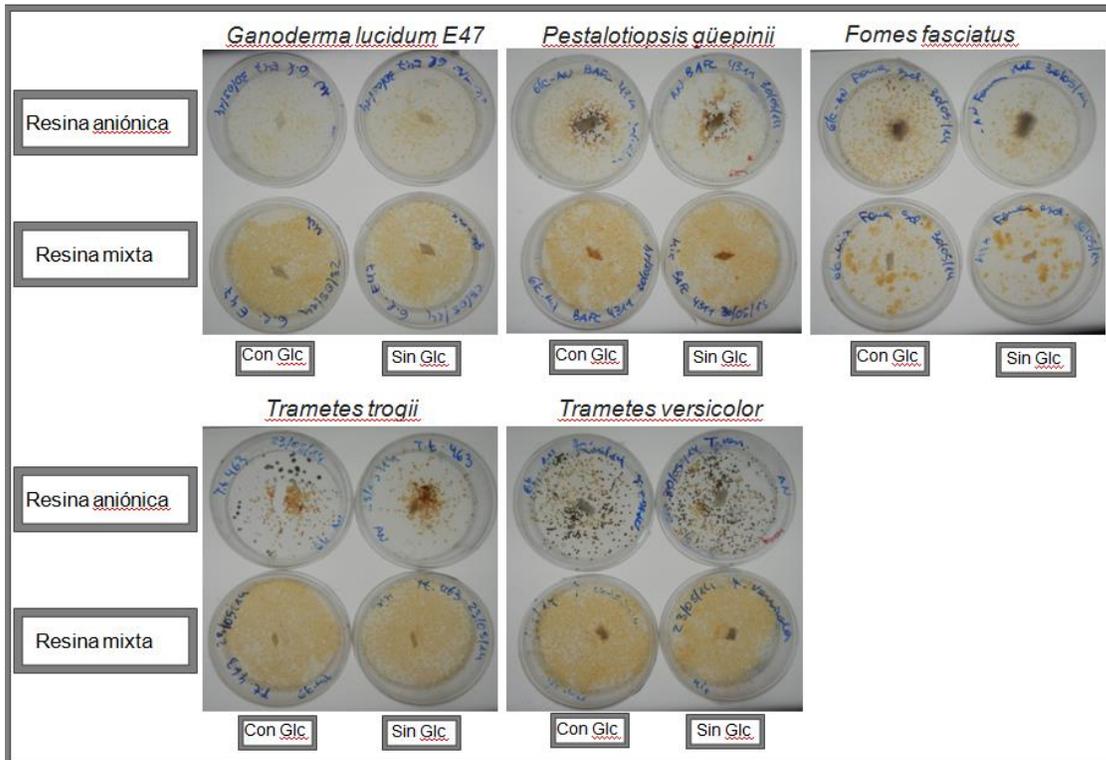


Figura 1: Especies de hongos cultivados en medio Agar-Agua en presencia de resina aniónica y mixta con agregado de glucosa 5% y sin esta.

Las mismas resinas aniónicas que fueron cultivadas en agar agua y las diferentes especies de hongos, se observaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM). Se pudo observar una correlación directa entre la visualización macroscópica (oscurecimiento de las resinas) y lo observado a través de las imágenes SEM. En la Figura 2 se observa una resina control, sin cultivar, donde no hay presencia de material sobre la misma así como tampoco ocurrió con aquellas cultivadas con *F. fasciatus*, *G. lucidum* y *P. güepinii*. Las resinas aniónicas cultivadas con *T. versicolor* (Figura 3) y con *T. trogii* (Figura 4) si presentaron crecimiento fúngico sobre las mismas (Milstein et al., 1992).

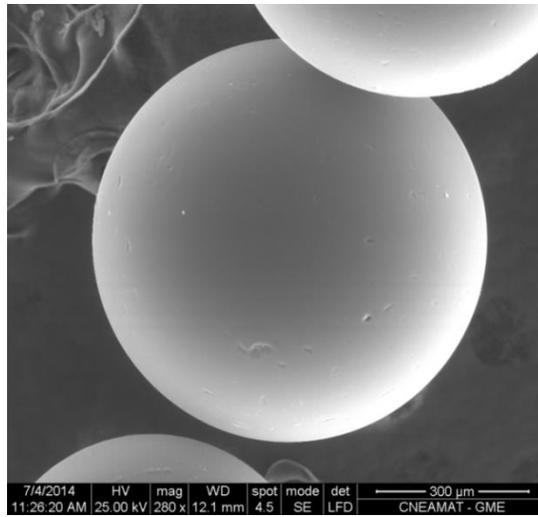


Figura 2: Imagen SEM de resinas control

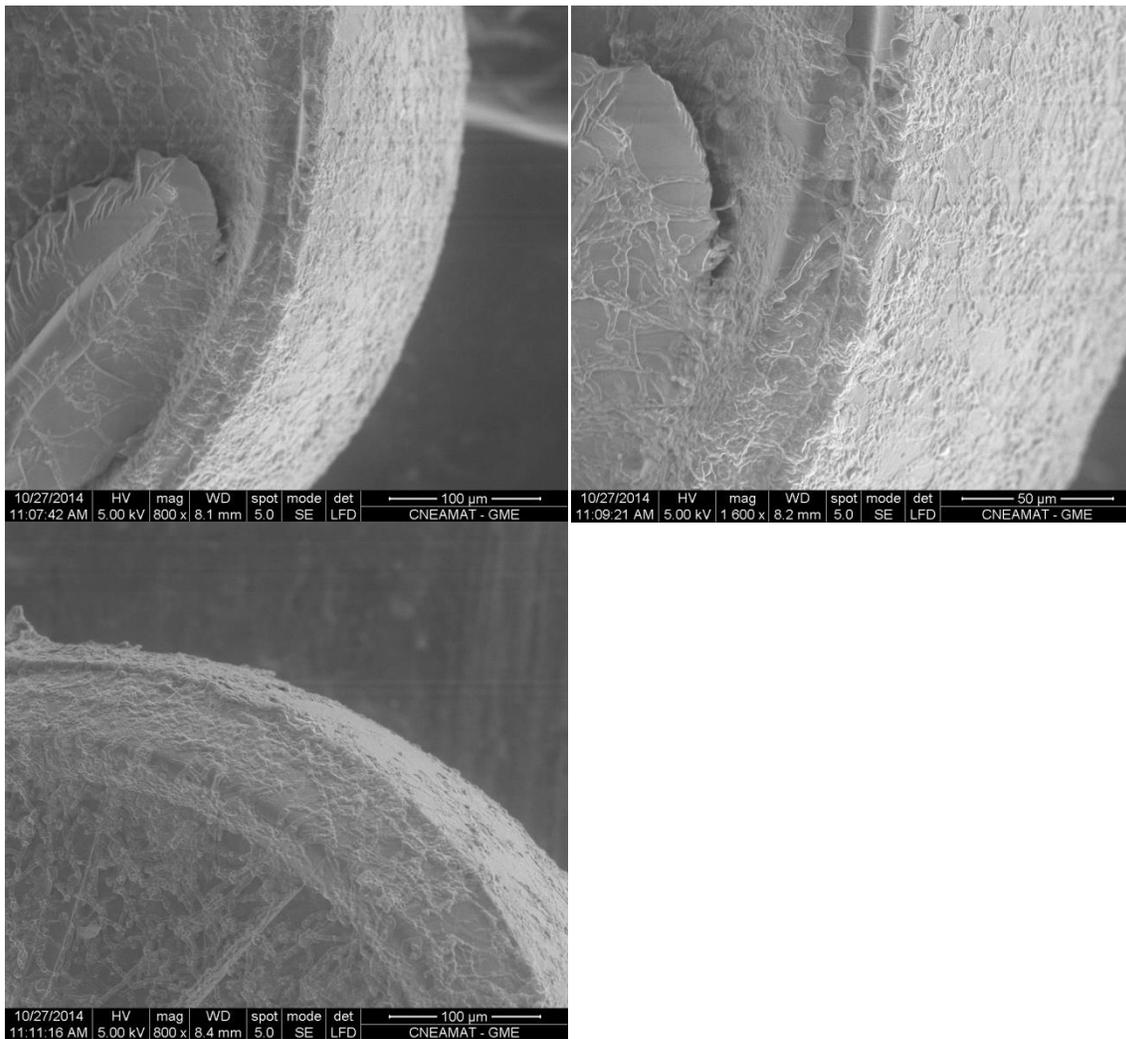


Figura 3: Imagen SEM de resina aniónica cultivada con *T. versicolor*

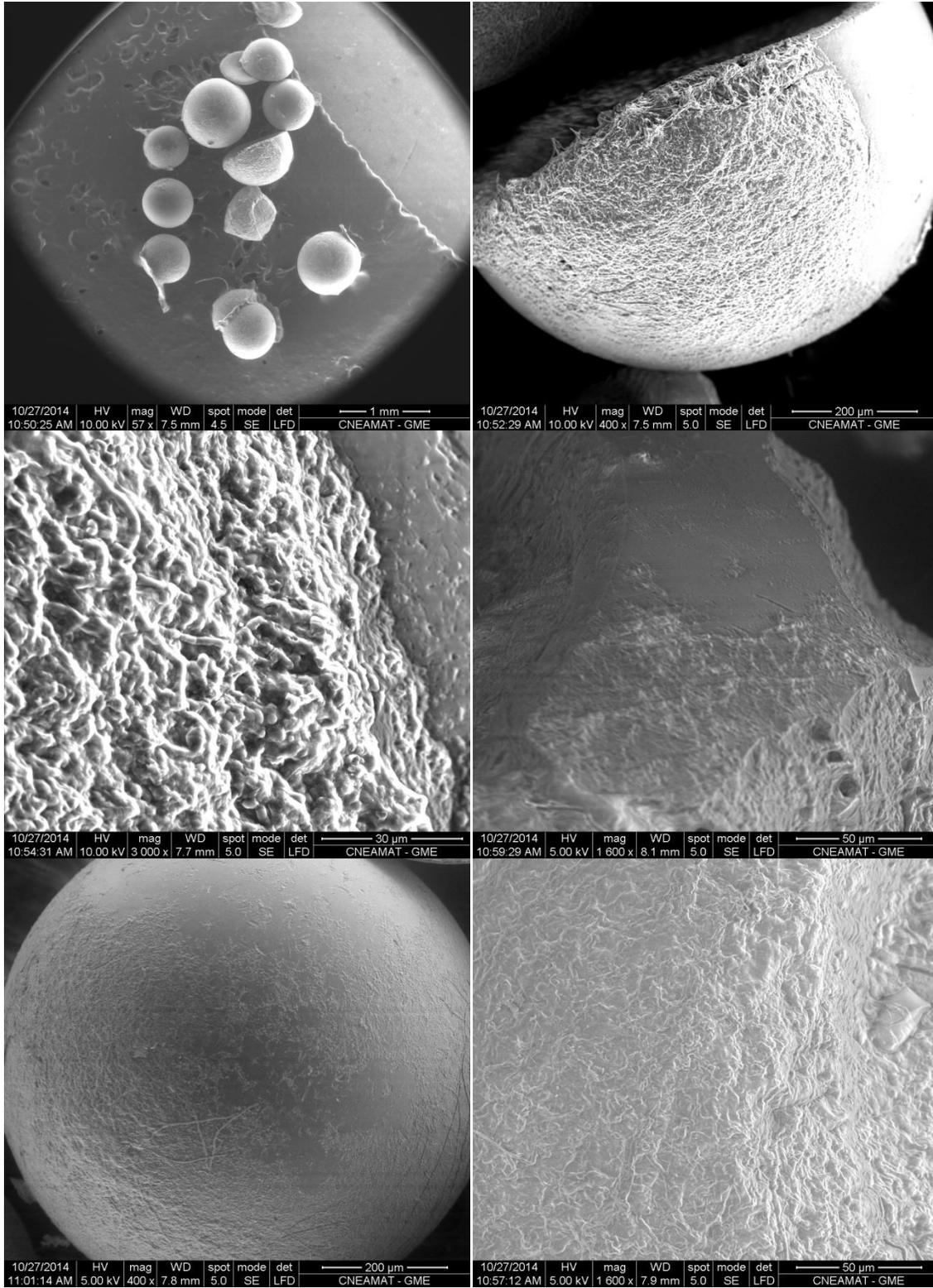


Figura 4: Imagen SEM de resina aniónica cultivada con *T. trogii*

El crecimiento radial de *T. versicolor* y *T. trogii* (Figura 5) en contacto con resina aniónica en medio rico en nutrientes, resultó más lento con respecto al control sin resina, en ambos hongos. Sin embargo, *T. versicolor* pudo crecer con mayor velocidad y de forma más homogénea que *T. trogii*. En las resinas catiónicas no se detectó desarrollo fúngico.

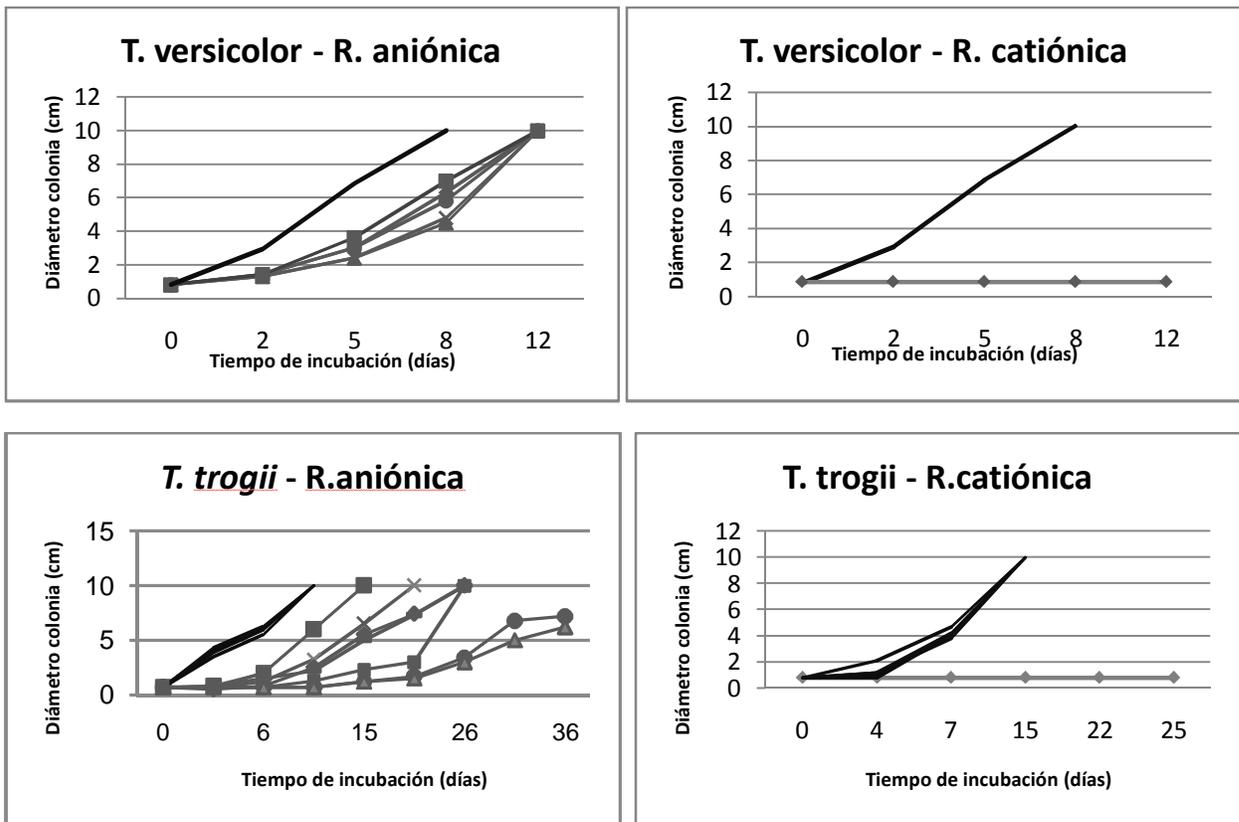


Figura 5: Crecimiento radial en medio de cultivo Glucosa-Asparagina de *T. trogii* y *T. versicolor* con resina aniónica y catiónica.

Las resinas aniónicas y catiónicas en contacto con el medio de cultivo líquido Glucosa-Asparagina produjeron un cambio de coloración en el mismo (Figura 6). El medio de cultivo se tornó color azul con la resina aniónica y naranja con resina catiónica, respecto del color verde del medio control. Estos cambios de coloración en los medios de cultivo han sido observados con resinas fenólicas (Ponce Andrade et al., 2012)

La actividad enzimática de la enzima lacasa evaluada en el medio, se correlacionó con lo observado en el crecimiento radial. Los hongos cultivados en presencia de resina aniónica pudieron crecer y por lo tanto producir enzima, sin embargo, aquellos cultivados con resina catiónica no lo hicieron (Figuras 7 y 8).



Figura 6: cambio de coloración del medio de cultivo con resina aniónica y catiónica respecto del control

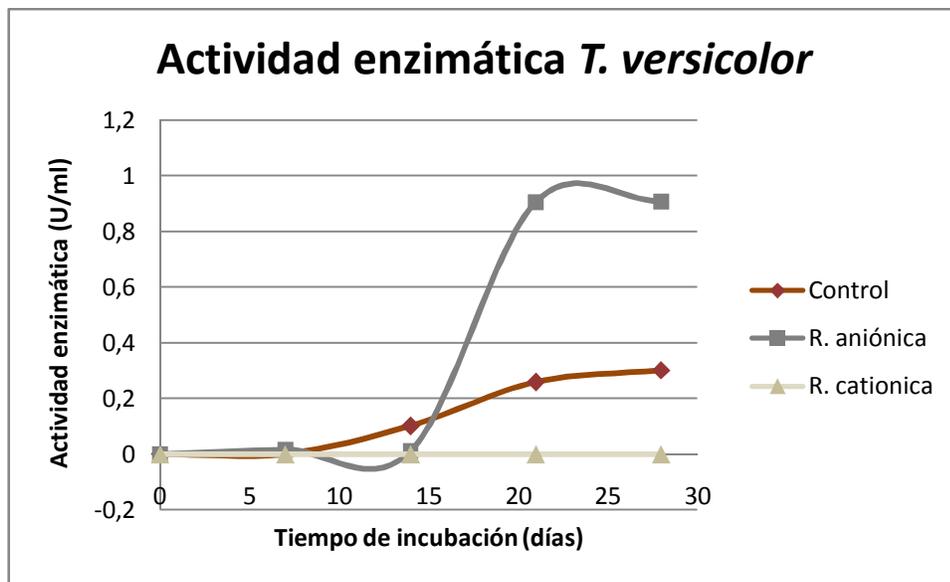


Figura N°7: actividad enzimática de enzima lacasa de *T. versicolor*

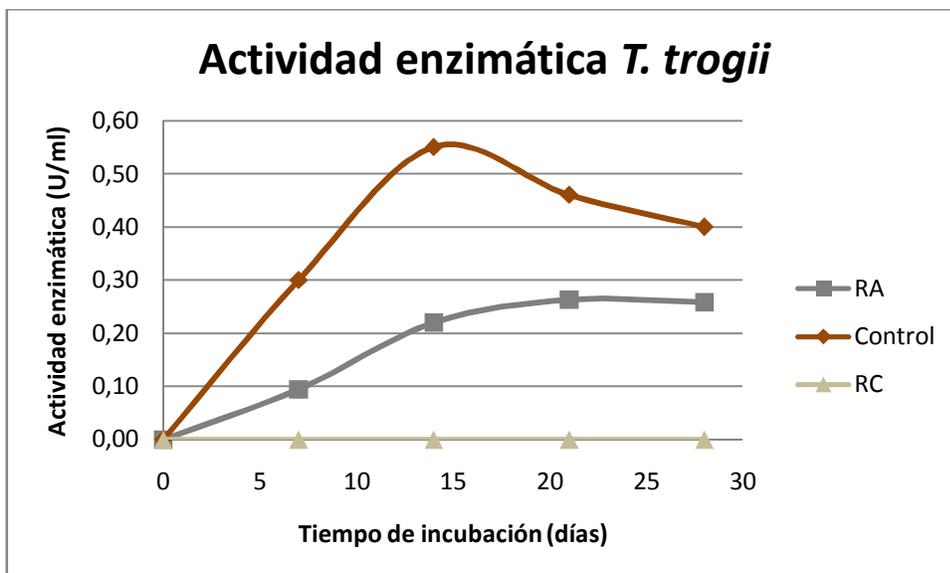


Figura N°8: actividad enzimática de enzima lacasa de *T. trogii*

Los títulos de lacasa valorados en *T. versicolor* creciendo con la resina aniónica resultaron marcadamente superiores a los detectados en el cultivo control. Los compuestos aromáticos son conocidos como inductores de la producción de lacasa en la especie *T. versicolor* (Levin et al., 2016) y en otros hongos ligninolíticos, esto podría haber producido el gran aumento de la actividad lacasa en las muestras cultivadas con resina aniónica de estructura aromática.

En *T. trogii* la actividad enzimática en las muestras control fue superior a las del hongo cultivado con resina aniónica, sin observarse el efecto producido por los compuestos aromáticos como en *T. versicolor*. Las diferencias registradas podrían atribuirse a una adsorción de la enzima a la resina.

Tanto en *T. versicolor* como en *T. trogii*, no se observó desarrollo fúngico ni actividad enzimática en los cultivos con resina catiónica. La resina de intercambio iónico catiónica, además de provocar un descenso de pH en el medio de cultivo, disminuyó la concentración de cobre, conocido inductor de la producción de lacasa (Levin et al., 2002) (Figura 9).

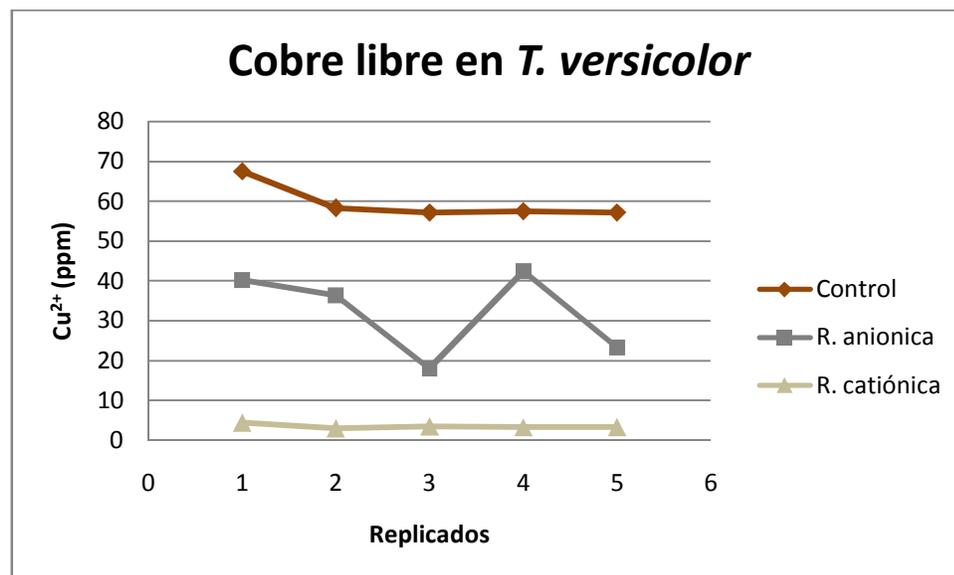


Figura N°9: concentración de cobre

En conclusión, *T. trogii* y *T. versicolor* fueron capaces de crecer en presencia de resina aniónica y no así en presencia de resina catiónica. Esta última produjo una inhibición en el desarrollo fúngico relacionado con la disminución en la disponibilidad de cobre u otros micronutrientes no evaluados en el ensayo, necesarios para su crecimiento y presentes en el medio de cultivo, por intercambio catiónico con la resina.

REFERENCIAS

- Grassi, E., P. Scodeller, N. Filiel, R. Carballo, and L. Levin. 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65:635-643.
- Hori, C., and D. Cullen. 2016. Prospects for Bioprocess Development Based on Recent Genome Advances in Lignocellulose Degrading Basidiomycetes. *In* Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Springer. 161-181.
- Hou, H., J. Zhou, J. Wang, C. Du, and B. Yan. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*. 39:1415-1419.
- Kaur, P., N.K. Bhardwaj, and J. Sharma. 2016. Application of Microbial Enzymes in Dissolving Pulp Production. *In* Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology. Springer. 133-156.
- Kües, U. 2015. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology*. 33:268-278.
- Levin L., Forchiassin F., and Ramos A.M. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the White-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, 94:377-383
- Levin L., Carabajal M., Hofrichter M., and R. Ullrich. 2016. Degradation of 4-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 107:174-179.
- Milstein O., Gersonde R., Huttermann A., Chen M.J., and Meister J.J. 1992. Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers. *Applied & Environmental Microbiology* 58:3225-3232.
- Pointing, S.B., and L. Vrijmoed. 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16:317-318.

- Ponce Andrade G.I., Vázquez Duhalt R., Jáuregui Rincón J., et al, 2012. Evidencia de la biodegradación de resinas fenólicas con hongos ligninolíticos por microscopía electrónica de barrido+ *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28:159-166.
- Rao, M., R. Scelza, F. Acevedo, M. Diez, and L. Gianfreda. 2014. Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*. 107:145-162.
- Ruqayyah, T., P. Jamal, M. Alam, M.E.S. Mirghani, I. Jaswir, and N. Ramli. 2014. Application of response surface methodology for protein enrichment of cassava peel as animal feed by the white-rot fungus *Panus tigrinus* M609RQY. *Food Hydrocolloids*. 42:298-303.
- Songulashvili, G., V. Elisashvili, S. Wasser, E. Nevo, and Y. Hadar. 2006. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters*. 28:1425-1429.