

Degradación de Boscalid mediante la actividad enzimática de lacasa por *Trametes versicolor*

Boscalid (Cantus) degradation via laccase enzymatic activity by *Trametes versicolor*

María Lucero Sandoval Sánchez¹, María Leilani Reynoso López¹, Isaac Fernández Villanueva¹, Juliana Magali Badillo Valencia¹, Lesly Paola Tonantzin Fuentes Estrada¹, Dra. Sarai Camarena Martínez¹, Graciela M. L. Ruiz Aguilar¹,

¹Departamento de Ciencias Ambientales, DICIVA, CIS, Universidad de Guanajuato
gracielar@ugto.mx¹

RESUMEN

El boscalid es un fungicida que se utiliza para controlar diversas actividades fúngicas en plantas y frutos, sin embargo, es persistente en el ambiente y presenta toxicidad. *Trametes versicolor* es un hongo con capacidad de producir lacasas y degradar contaminantes orgánicos. En este estudio se evaluó la actividad enzimática de lacasa (U/mL) producida por *T. versicolor* en suelo arcilloso contaminado con boscalid (100 y 200 ppm) durante un periodo de incubación de 10 días. También se determinó la concentración de glucosa (mg/dL) y DQO (mg/L) al inicio y al final del tratamiento. En este estudio, la actividad de la enzima lacasa producida por *T. versicolor* no fue inhibida por la presencia de boscalid a ninguna de las dos concentraciones 100 y 200 ppm. En todos los tratamientos, independientemente su concentración de boscalid y adición de enzimas producidas por *T. versicolor*, se presentó una remoción de glucosa y DQO. Además, la actividad lacasa fue estimulada principalmente por la presencia de contaminante. Con base a los resultados obtenidos, se puede decir que las enzimas secretadas por *T. versicolor* tienen potencial para la biorremediación de suelos contaminados con boscalid.

Palabras clave: Boscalid, Contaminación de suelo, *Trametes versicolor*, Actividad enzimática, Lacasa

ABSTRACT

Boscalid is a fungicide used to control various fungal activities in plants and fruits; however, it is persistent in the environment and exhibits toxicity. *Trametes versicolor* is a fungus capable of producing laccases and degrading organic pollutants. In this study, the laccase enzymatic activity (U/mL) produced by *T. versicolor* was evaluated in clay soil contaminated with boscalid (100 and 200 ppm) over a 10-day incubation period. Additionally, glucose concentration (mg/dL) and COD (mg/L) were determined at the beginning and end of the treatment. The results indicated that laccase activity produced by *T. versicolor* was not inhibited by the presence of boscalid at either concentration (100 or 200 ppm). Glucose and COD removal was observed in all treatments, regardless of the boscalid concentration and the addition of enzymes produced by *T. versicolor*. Moreover, laccase activity was primarily stimulated by the presence of the contaminant. Based on these results, it can be concluded that enzymes secreted by *T. versicolor* have potential for the bioremediation of soils contaminated with boscalid.

1. INTRODUCCIÓN

El boscalid, comercialmente conocido como Cantus con nombre químico según la IUPAC es 3-piridincarboxamida (C₁₈H₁₂Cl₂N₂O), es un fungicida de amplio espectro que se utiliza extensamente en la agricultura para controlar diversas enfermedades fúngicas. Su persistencia en el medio ambiente y su potencial toxicidad para organismos no objetivo han generado preocupaciones significativas sobre su impacto ambiental (INECC, 2004; Vu et al., 2015). En estudios de monitoreo de contaminantes en México se ha detectado la presencia de residuos de boscalid en la producción primaria de vegetales (SENASICA, 2013). La respiración del suelo y la actividad enzimática son considerados como indicadores de la calidad del suelo (Sallato et al., 2007; Xiong et al., 2014). Se ha determinado que la presencia de concentraciones de 10 a 200 ppm de boscalid inhibe la actividad de la fosfatasa significativamente y de 10 a 100 ppm también se inhibe la respiración del suelo (Xiong et al., 2014). Por ello, la necesidad de métodos eficientes y ecológicos para la degradación de boscalid es cada vez más importante.

Las enzimas ligninolíticas, particularmente la lacasa, han demostrado un potencial prometedor en la biodegradación de una amplia gama de compuestos recalcitrantes. Las lacasas son enzimas oxidoreductasas producidas por hongos de la podredumbre blanca, como *Trametes versicolor*, que catalizan la oxidación de diversos sustratos mediante la reducción del oxígeno molecular a agua (Collins & Dobson, 1997; Janusz et al., 2020). Este proceso no solo es eficiente sino también respetuoso con el medio ambiente, ya que no genera subproductos tóxicos.

T. versicolor es un hongo ampliamente estudiado por su capacidad de producir lacasas y su efectividad en la degradación de contaminantes orgánicos. La inoculación de *T. versicolor* en medios adecuados puede inducir la producción de lacasa en cantidades suficientes para aplicaciones biotecnológicas (Kirk & Farrell, 1987). En este contexto, explorar la capacidad de la lacasa producida por *T. versicolor* para degradar boscalid podría ofrecer una solución viable y sostenible para la mitigación de la contaminación por fungicidas.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el comportamiento de la actividad lacasa producida por *T. versicolor* en la degradación de boscalid, mediante el análisis de muestras y tratamientos específicos del medio.

2. METODOLOGÍA

2.1. Muestreo de suelo

Se tomaron muestras de suelo en el campo de riego de la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato – Salamanca, División de Ciencias de la Vida. Las coordenadas del sitio de muestreo fueron 20°44'42" N 101°19'38" O, elevación 1743 m. Se tomaron seis muestras aleatorias de suelo, cada una a 20 cm de profundidad en suelo semi-húmedo.

2.2. Caracterización del suelo

2.2.1. Humedad

La determinación de humedad se realizó por triplicado en un analizador de humedad MB35 Halogen (OHAUS®). Se registró un porcentaje de humedad de $16.60 \pm 1.09\%$.

2.2.2. Determinación de pH

Se preparó el suelo considerando una relación 1:2 en medio acuoso (suelo: agua) y se agitó la mezcla por 30 minutos a 150 rpm. Después se dejó reposar 15 minutos y se midió el pH por triplicado usando potenciómetro portátil OAKTON EcoTestr®. El pH del suelo registrado fue 7.60 ± 0.01 a 25.3 °C.

2.2.3. Densidad real

Se determinó la densidad real por triplicado mediante el método AS-04 (método del picnómetro) de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se registró una densidad real de 2.189 ± 0.031 g/cm³.

2.2.4. Densidad aparente

Se determinó la densidad aparente por triplicado según el método AS-04 de la NOM-021-SEMARNAT-2000. La densidad aparente del suelo fue 1.018 ± 0.048 g/cm³.

2.2.5. Nitrógeno total

Se determinó el nitrógeno total con base a la norma NOM-021-SEMARNAT-2000, con ayuda de un digestor y destilador marca BUCHI® Distillation Unit K-350. Para ello, se empleó 1.0 ± 0.1 g de suelo seco a un pH de 3.0 ± 0.1 . Se obtuvo un contenido de nitrógeno en el suelo de 0.0050 ± 0.0029 mg.

2.2.6. Textura

Se determinó la textura del suelo por el método Bouyoucos (NOM-021-SEMARNAT-2000). Para ello se empleó una probeta de 1000 mL, un hidrómetro para suelos ASTM 152H y un termómetro de mercurio con un rango de escala de -20 a 150°C . Las proporciones del suelo fueron 38.2 ± 4.4 de arena, 41.8 ± 2.8 % de arcilla y 20.0 ± 1.8 % de limo. La textura del suelo fue arcillosa de acuerdo con el triángulo textural.

2.3. Inoculación de *T. versicolor*

El hongo se sembró en medio sólido PDA (Potato Glucose Agar por sus siglas en inglés). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con las indicaciones del proveedor (SIGMA-ALDRICH®). Una vez sembradas las placas estas se dejaron a temperatura ambiente ($28 \pm 5^\circ\text{C}$) durante un período de 6 días.

Transcurrido este tiempo, se inóculo en medio líquido utilizando el hongo crecido en medio PDA. Para ello se empleó medio Kirk (Kirk & Farrell, 1987), el cual se modificó y se preparó añadiendo las siguientes cantidades por litro de solución: 2.0 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de CaCl_2 dihidratado, 2.0 g de NH_4NO_3 , y 40.9 g de Glucosa (dextrosa). El hongo se dejó crecer en medio Kirk modificado a temperatura ambiente ($28 \pm 5^\circ\text{C}$) en agitación a 150 rpm durante un período de 6.0 días.

Se filtraron las enzimas producidas por *T. versicolor* al vacío dentro de campana bacteriológica con ayuda de un matraz Kitasato de 500 mL y un filtro colocado en embudo de porcelana. El pH del filtrado fue de 3.7. Este filtrado se empleó para preparar los tratamientos indicados en la Tabla 1.

2.4. Diseño experimental

Se evaluaron dos concentraciones de contaminante Boscalid (100 y 200 ppm) en el suelo, previamente molido y tamizado utilizando una malla No 12. Posteriormente se adicionó el líquido filtrado del medio donde creció el hongo (según la Tabla 1). Todos los tratamientos fueron incubados a temperatura ambiente ($28 \pm 5^\circ\text{C}$) por un período de 10 días y se realizaron por triplicado al igual que los controles. Se evaluó la actividad lacasa de *T. versicolor* al inicio y al término del experimento. Se establecieron tres controles: uno sin boscalid y presencia del filtrado (control C1), otro sin el filtrado enzimático el cual fue reemplazado con medio Kirk modificado (control C2) y finalmente, el control abiótico (C3) se esterilizó previo al inicio del experimento (ver Tabla 1).

Además, se evaluó la cantidad de glucosa presente para deducir su posible influencia en el proceso al inicio y final del experimento. Lo mismo se realizó para la determinación de la DQO, la cual se utilizó como un indicador de la degradación del contaminante.

Tabla 1. Condiciones de cada tratamiento incluidos en los ensayos para la degradación de Boscalid por T. versicolor.

Tratamiento	Suelo (g)	Filtrado (mL)	Boscalid (ppm)
T1	5	60	100
T2	5	60	200
C1	5	60	N/A
C2	5	N/A	200
C3*	5	60	200

Todos los tratamientos se prepararon por triplicado usando un volumen total de 60 mL.

*El tratamiento C3 se esterilizó a 121 °C a 15 psi durante 15 minutos después de su preparación y posteriormente se adicionó el contaminante.

2.5. Determinación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad de la lacasa por el método propuesto por Liu et al. (2009). La mezcla de reacción (1.0 mL), está constituida por acetato de sodio 50 mM (pH 4.5), 1.8 mM de 2,2'-Azino-bis-(3-etilbezotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y extracto suficiente para generar una reacción. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm empleando un espectrofotómetro UV-visible SPECTRO UV-2505 (Labomed, Inc.®). Se considero un coeficiente de extinción molar de 36 000 mM⁻¹ cm⁻¹. La unidad (U) de lacasa produce 1.0 μmol de ABTS después de oxidarse al pasar 60 s. Se registraron las absorbancias por triplicado de cada tratamiento a los 30 s y 60 s de reacción.

2.6. Determinación química de oxígeno (DQO)

La determinación de DQO se realizó mediante el método de colorimetría utilizando el kit HI93754B-25 (HANNA® instruments) y un multiparamétrico modelo HI 839800 (HANNA® instruments). Se siguió el procedimiento indicado por el proveedor. Para la determinación de DQO de las muestras, estas se diluyeron hasta un factor de dilución de 1:40, al inicio y al final del experimento.

2.7. Determinación de glucosa

La determinación cuantitativa de la glucosa se realizó empleando el kit Glucose-LQ (SPINREACT®). Se siguió el procedimiento indicado por el proveedor. Se efectuó una dilución 1:75 de cada una de las muestras. Se tomó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro UV-visible SPECTRO UV-2505 (Labomed, Inc.®) a una longitud de onda de 505 nm y una temperatura de 37 °C, al inicio y al final del experimento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la expresión de la actividad de lacasa

Se observó un aumento de la actividad lacasa (U/mL) en los tratamientos T1, T2 y control C2 en las mediciones realizadas a los 30 y 60 segundos de iniciada la reacción, al final del experimento. En contraste, en los controles C1 y C3 se registró una disminución en las mediciones realizadas (Figura 1 y Figura 2).

La disminución de la actividad lacasa en el control C3 se debe a que las enzimas fueron inactivadas debido a que este tratamiento se sometió a esterilización después de su preparación. Lo anterior era un resultado esperado y se ratificó al final del experimento.

El control C2 se observó un incremento de la actividad lacasa aunque en este tratamiento no se añadió filtrado del medio de cultivo. Esto pudo deberse a la presencia de microorganismos nativos en el suelo que también tienen la capacidad de secretar esta enzima. No obstante, la actividad lacasa en este tratamiento fue menor con respecto a los tratamientos T1 y T2 en los cuales sí se añadió filtrado.

Es interesante destacar que la actividad de la lacasa se ve estimulada por la presencia de contaminante ya que en el control C1, donde se añadió filtrado, pero contenía contaminante, se observó una disminución en la actividad de la lacasa.

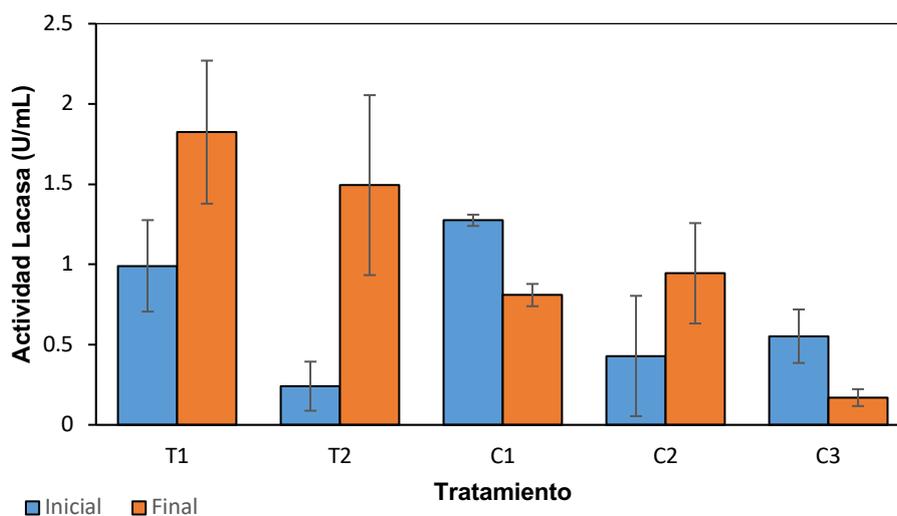


Figura 1. Variación de la actividad enzimática de lacasa (U/mL) al inicio (barras azules) y al final (barras naranjas) del periodo de incubación (10 días) (tiempo de reacción 30 s).

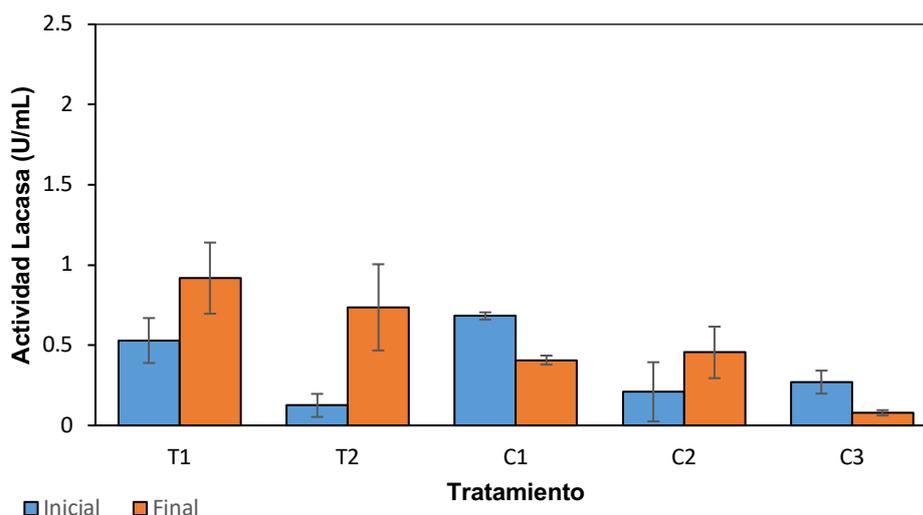


Figura 2. Variación de la actividad enzimática de lacasa (U/mL) al inicio (barras azules) y al final (barras naranjas) del periodo de incubación (10 días) (tiempo de reacción 60 s).

3.2. Consumo de glucosa en el experimento

En todos los tratamientos, excepto en el control C3, se observó una disminución de glucosa al finalizar el periodo de incubación de 10 días. La concentración de glucosa disminuyó significativamente en los tratamientos T1 y T2, y en el control C1, con los siguientes resultados: de 2643.1 mg/dL inicial a 522.2 mg/dL final en T1; de 2590.4 mg/dL inicial a 522.2 mg/dL final en T2; y de 321.4 mg/dL inicial a 110.8 mg/dL final en C2. Esta reducción en la glucosa puede atribuirse principalmente a la presencia de enzimas en el filtrado de *T. versicolor*. La presencia de contaminante a distintas concentraciones (100 y 200 ppm) no afectó el desempeño de las enzimas para consumir glucosa, ya que en T1 y T2 (tratamientos con boscalid) se obtuvo una disminución de glucosa similar a la del control C1 (tratamiento sin boscalid).

En el control C3, se presentó un ligero incremento de glucosa, con valores inicial y final de 3512.8 y 3876.6 mg/dL, respectivamente. Este resultado no es significativo dado que está dentro de la barra de error y que era de esperar, ya que el control se esterilizó. En el control C2, se registró un valor inicial de 2846.4 mg/dL y un valor final de 1487.3 mg/dL. Esta disminución fue menor en comparación con los tratamientos T1, T2 y control C1, lo cual era previsible ya que en el control C2 no se agregó filtrado. Los resultados obtenidos en el análisis de glucosa se muestran en la Figura 3.

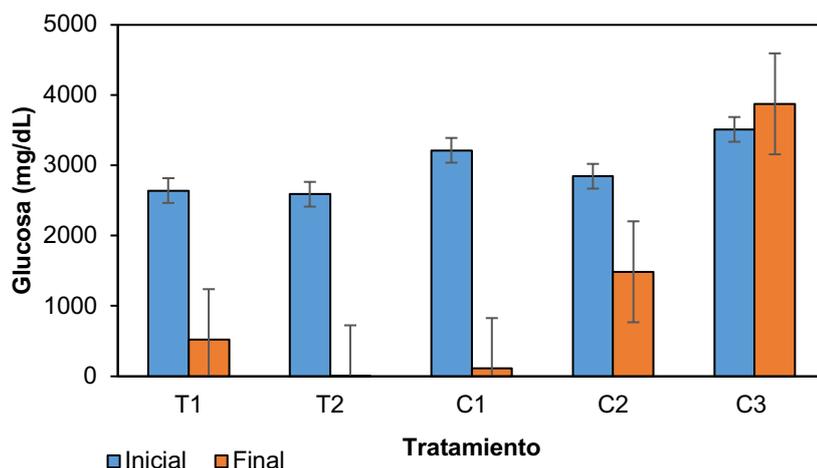


Figura 3. Cambio en la concentración de glucosa (mg/dL) al inicio (barras azules) y al final del (barras naranjas) del periodo de incubación (10 días).

3.3. Variación de la demanda química de oxígeno en el experimento

En la Figura 4 se observa el comportamiento de la DQO en los tratamientos y controles al comparar el valor inicial (en azul) con el valor final (en naranja) después de un periodo de incubación de 10 días. Se registró una disminución de la DQO en todos los tratamientos excepto en el control C3. Esto era de esperarse dado que es el control abiótico y refleja que las variaciones pueden atribuirse a las enzimas presentes en el filtrado y en el propio suelo.

El tratamiento con mayor reducción de DQO fue el T2, donde se observó la mayor diferencia entre los valores iniciales (41093.3 ± 909.8 mg/L) y finales (16720.0 ± 961.7 mg/L). Por otro lado, el control en el cual se observó un aumento de DQO fue el C3, en donde los valores iniciales fueron (38100.0 ± 1725.3 mg/L) y finales (44466.7 ± 1300.7 mg/L). Se observa una ligera remoción de DQO independientemente de la presencia de contaminante a distintas concentraciones (100 y 200 ppm), en T1 y T2 (tratamientos con boscalid) se obtuvo una disminución de DQO similar a la de C1 (control sin boscalid). A pesar de estos resultados, se observa la influencia de la presencia de enzimas y la participación de la glucosa en la remoción del contaminante.

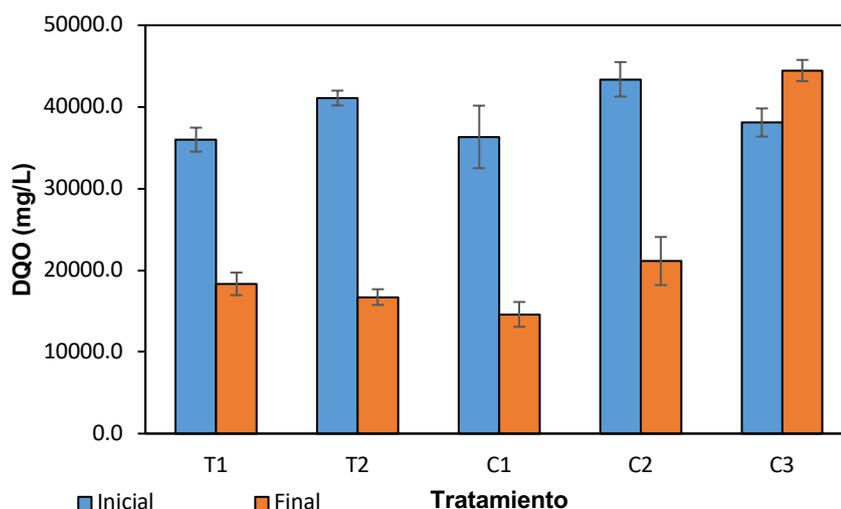


Figura 4. Determinación química de oxígeno (DQO) al inicio (barras azules) y al final del (barras naranjas) del periodo de incubación (10 días).

4. CONCLUSIONES

En este estudio, la actividad de la enzima lacasa producida por *Trametes versicolor* no fue inhibida por la presencia de boscalid a 100 y 200 ppm (T1 y T2, respectivamente).

En todos los tratamientos (T1 y T2) y controles (C1 y C2) se observó una disminución de glucosa y de DQO después de 10 días de incubación a excepción del control abiótico (C3). El control en el cual no se añadió filtrado de enzimas, pero si contaminante boscalid (C2) no hubo incremento de la actividad enzimática a diferencia de los tratamientos en los que si se añadió contaminante y filtrado (T1 y T2). Por lo que la actividad lacasa fue estimulada por la presencia de boscalid.

Se recomienda para posteriores trabajos de investigación ampliar el periodo de incubación, además de hacer mediciones periódicas de la actividad lacasa así como de otras enzimas que pudieran intervenir en el metabolismo de la degradación de boscalid.

Con base a los resultados obtenidos, se puede decir que las enzimas secretadas por *T. versicolor* tienen potencial para la biorremediación de suelos contaminados con boscalid.

5. BIBLIOGRAFÍA

Collins PJ, Dobson A. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Sep;63(9):3444-50. doi: 10.1128/aem.63.9.3444-3450.1997.

INECC, 2004. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (Primera edición). SEMARNAT. México.

Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkołazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>

Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-501. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002341>

Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., & Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7), 426-433.

Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. [Fecha de consulta en línea: 24 julio 2024]. Disponible en: <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>

Sallato, B. V., Torres, R., Zoffoli, J. P., & Latorre, B. (2007). Effect of boscalid on postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(1), 67-78. <https://doi.org/10.5424/sjar/2007051-224>

SENASICA, 2013. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Programa Nacional de Monitoreo y control de residuos tóxicos y contaminantes en la producción primaria de alimentos de origen agrícola, pecuario, acuícola y pesquero. SAGARPA. México D. F.

Vu, H. T., Keough, M. J., Long, S. M., & Pettigrove, V. J. (2016). Effects of the boscalid fungicide Filan® on the marine amphipod *Allorchestes compressa* at environmentally relevant concentrations. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(5), 1130-1137.

Xiong, D., Li, Y., Xiong, Y., Li, X., Xiao, Y., Qin, Z., & Xiao, Y. (2014). Influence of boscalid on the activities of soil enzymes and soil respiration. *European Journal of Soil Biology*, 61, 1-5.