

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: **SOBRINO SILVA, ALBERTO**  
D.N.I./PASAPORTE: \*\*\*\*0878B

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D410-BIOLOGÍA FUNCIONAL Y BIOTECNOLOGÍA**  
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**  
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 31/10/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO**.

Sobre el siguiente tema: *SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA EL DESARROLLO DE PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SUBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 31 de octubre de 2017

EL PRESIDENTE



Fdo.: M.ª Jesús Martínez

EL SECRETARIO



Fdo.: Juane Rodríguez

EL VOCAL



Fdo.: Elisabet Areudo

Con fecha 28 de noviembre de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

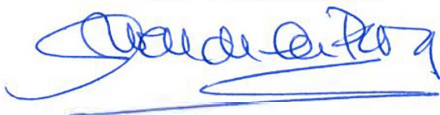
- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: Alberto Sobrino

La Secretaria de la Comisión Delegada



<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



Universidad  
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES  
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 28 de noviembre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *SOBRINO SILVA, ALBERTO*, el día 31/10/17, titulada *SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA EL DESARROLLO DE PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

**MENCIÓN "CUM LAUDE"**

Alcalá de Henares, 7 de diciembre de 2017

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS  
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: *SOBRINO SILVA, ALBERTO*

Secretario del Tribunal: *JUANA RODRÍGUEZ BULLIDO*. T.U. Dpto. Biomedicina y Biotecnología.  
Unv. de Alcalá

Director/a de Tesis: *FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO*





Universidad  
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO  
Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo  
presentado la misma en formato:  soporte electrónico  impreso en papel, para el depósito de la  
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: \_\_\_\_\_ se procede, con  
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



Fdo. El Funcionario



**Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología**

# **SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA EL DESARROLLO DE PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA**

**Tesis Doctoral presentada por  
ALBERTO SOBRINO SILVA**

**Director/a:  
DR. FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO**

**Alcalá de Henares, 2017**





Universidad  
de Alcalá

Leonardo M. Casano Mazza, Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología

**INFORMA** que la Tesis Doctoral titulada “Selección de microorganismos para el desarrollo de procesos de biooxidación avanzada”, presentada por D/D<sup>a</sup> Alberto Sobrino Silva, bajo la dirección del / de la Dr/a. Francisco Guillén Carretero reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. Esta Comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 31 de julio de 2017.

Fdo.: Leonardo M. Casano Mazza





**D. Francisco Guillén Carretero**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá,

**INFORMA** que D. Alberto Sobrino Silva ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, la Tesis Doctoral titulada "Selección de microorganismos para el desarrollo de procesos de biooxidación avanzada", la cual reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para su presentación a trámite y ser defendida ante un tribunal.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 31 de julio de 2017.



Fdo.: Francisco Guillén Carretero



## RESUMEN

En los últimos años se ha desarrollado una normativa más estricta respecto a la contaminación de las aguas que ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de tratamiento más eficientes. Entre estas tecnologías destacan la aplicación de procesos de oxidación avanzada (POA) y hongos de podredumbre blanca (ligninolíticos) y sus enzimas. La idoneidad de estas tecnologías se debe a la baja especificidad y alta reactividad de los agentes implicados en la degradación. En los procesos de oxidación avanzada se generan oxidantes fuertes, principalmente radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), como por ejemplo a través del reactivo de Fenton. Por otra parte, los hongos ligninolíticos poseen un sistema enzimático muy inespecífico capaz de actuar directamente sobre una gran variedad de compuestos contaminantes. Además, estos hongos son capaces de producir agentes de bajo peso molecular y alto potencial redox que incrementan notablemente el rango de compuestos susceptibles de degradación. Dichos agentes incluyen los radicales hidroxilo, que pueden generarse, entre otros mecanismos, a través del establecimiento de ciclos redox de quinonas en presencia de ión férrico. La inducción de  $\cdot\text{OH}$  puede llevarse a cabo en incubaciones del hongo con una quinona y hierro convenientemente quelado, y se ha demostrado su eficacia en la degradación de compuestos contaminantes, como colorantes textiles y BTEX. La aplicación de este sistema resulta especialmente interesante ya que fusiona las características de los POA y el tratamiento biológico. Si bien su existencia se ha demostrado en hongos de podredumbre blanca y parda, y en bacterias filamentosas con capacidad ligninolítica, podría tener lugar también en otros microorganismos ya que la distribución entre microorganismos de la actividad quinona reductasa (QR) necesaria para el establecimiento del ciclo redox es bastante amplia.

En esta tesis se estudia en el hongo de podredumbre blanca *Corioloropsis rigida* la influencia de distintos factores implicados en el establecimiento de ciclos redox de quinonas (actividad lacasa, pH, quelante del  $\text{Fe}^{3+}$  y presencia de  $\text{Mn}^{2+}$ ) sobre la producción de  $\cdot\text{OH}$  y se evalúa su potencial degradativo empleando como contaminantes modelo 27 colorantes textiles. El efecto del  $\text{Mn}^{2+}$  sobre los ciclos redox de quinonas fue estudiado en profundidad en el hongo de podredumbre parda *Gloeophyllum trabeum*, que produce 2,5-dimetoxibenzohidroquinona, quedando demostrado su papel en la oxidación de dicha hidroquinona y la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La posibilidad de inducir la producción  $\cdot\text{OH}$  mediante ciclos redox de quinonas en hongos ascomicetos se demuestra en *Aspergillus nidulans* y *Penicillium oxalicum*, empleando como condiciones óptimas en estos hongos pH 7,0 y EDTA como quelante del  $\text{Fe}^{3+}$ . Estas condiciones fueron aplicadas en la degradación de colorantes textiles, fármacos y disruptores endocrinos. Para demostrar la capacidad de producir  $\cdot\text{OH}$  en bacterias no filamentosas se emplearon como bacterias modelo *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli*, comprobando además en esta última, su efectividad en la degradación de colorantes textiles y fármacos. Finalmente se determinaron las condiciones necesarias para reutilizar el micelio del hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* y de *A. nidulans* en tandas diarias sucesivas de producción de  $\cdot\text{OH}$ , comprobando que el sistema no pierde eficacia durante varias semanas en la degradación de carbamazepina y New Coccine, respectivamente.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la posibilidad de inducir la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en varios grupos de microorganismos, pudiendo optimizar los niveles de estos en función de distintos factores, entre los que se incluyen el pH, quelante de hierro, presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  y los niveles de enzimas ligninolíticas. Se demuestra además como este sistema incrementa la capacidad degradativa de los microorganismos, logrando la biooxidación avanzada de diversos contaminantes del agua.



## ABREVIATURAS

AAO	Aril alcohol oxidasa
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AAD	Aril alcohol deshidrogenasa
ACN	Acetonitrilo
APO	Peroxigenasa aromática
ATCC	American Type Culture Collection
AV	Alcohol veratrílico
BQ	Benzoquinona
BQH <sub>2</sub>	Benzohidroquinona
BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno, <i>o- m- p</i> -Xileno
DBQ	Dimetoxi-1,4-benzoquinona
DBQ <sup>·-</sup>	Dimetoxi-1,4-benzosemiquinona
DBQH <sub>2</sub>	Dimetoxi-1,4-benzohidroquinona
DBQ(H <sub>2</sub> )	DBQ + DBQH <sub>2</sub>
CBZ	Carbamazepina
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
CDH	Celobiosa deshidrogenasa
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DyP	Peroxidasa decolorante de tintes
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de protección ambiental (EEUU)
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FAD	Flavin adenin dinucleótido
G	Unidad guayacilo
H	Unidad 4-hidroxifenilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de rábano
LiP	Lignina peroxidasa
MBQ	Metoxi-1,4-benzoquinona
MnP	Manganeso peroxidasa
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
PBOA	Proceso de biooxidación avanzada
POA	Proceso de oxidación avanzada
Q	Quinona
Q <sup>2-</sup> , QH <sub>2</sub> :	Hidroquinona.
Q <sup>·-</sup>	Semiquinona
QR	Quinona reductasa
R <sup>·</sup>	Radical alquilo.
RLO	Radicales libres de oxígeno

RO·	Radical alcoxilo.
RO <sub>2</sub> ·	Radical peroxilo.
S	Unidad siringilo
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias que reaccionan con el TBA
VP	Peroxidasa versátil

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	17
1.1. El problema actual de la contaminación de las aguas.....	3
1.2. Procesos de oxidación avanzada (POA).....	4
1.3. Potencial degradativo de los hongos ligninolíticos .....	7
1.3.1. Estructura de la lignina .....	7
1.3.2. Hongos de podredumbre parda .....	9
1.3.3. Hongos de podredumbre blanca .....	10
1.3.3.1. Lacasas .....	10
1.3.3.2. Peroxidasas .....	11
1.3.4. Generación de agentes ligninolíticos de bajo peso molecular .....	12
1.4. Procesos de biooxidación avanzada (PBOA) .....	14
1.5. Planteamiento del trabajo y objetivos .....	15
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
2.1. Compuestos y enzimas utilizados.....	19
2.2. Origen de los microorganismos.....	20
2.3. Cultivo de los microorganismos .....	21
2.3.1. Medios de cultivo .....	21
2.3.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos.....	22
2.3.3. Preparación de inóculos y condiciones de cultivo.....	22
2.3.3.1. Preparación de inóculos.....	22
2.3.3.2. Condiciones de cultivo .....	22
2.4. Incubaciones de los microorganismos para la producción de Radicales $\cdot\text{OH}$ .....	23
2.5. Biooxidación avanzada de Colorantes, Fármacos y disruptores endocrinos .....	23
2.6. Determinaciones analíticas .....	23
2.6.1. Medida de la cantidad de micelio.....	23
2.6.2. Estimación del crecimiento de bacterias.....	24
2.6.3. pH y soluciones tampón .....	24
2.6.4. Sustancias reductoras.....	24
2.6.5. Peróxido de hidrógeno .....	24
2.6.6. Ión Ferroso.....	25
2.6.7. Quinonas e hidroquinonas .....	25
2.6.8. Colorantes.....	25
2.6.9. Concentración de fármacos y disruptores endocrinos.....	27



2.6.10. Ácido homoverátrico, alcohol veratrílico, veratraldehído y mediadores de la lacasa..	28
2.6.11. Radical hidroxilo .....	28
2.7. Actividades enzimáticas .....	29
2.7.1. Actividad lacasa .....	29
2.7.2. Actividad quinona reductasa .....	29
2.7.3. Actividad peroxidasa.....	30
2.7.4. Actividad manganeso peroxidasa .....	30
2.8. Inducción, producción y purificación de la lacasa .....	30
2.9. Análisis estadísticos.....	30
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
3.1. Ciclos redox de quinonas.....	33
3.1.1. <i>Coriopsis rigida</i> .....	33
3.1.1.1. Condiciones de cultivo de <i>C. rigida</i> .....	33
3.1.1.2. Inducción de la lacasa y efecto del pH sobre su actividad y estabilidad .....	34
3.1.1.3. Oxidación de compuestos de tipo siringilo por la lacasa: producción de 2,6-DBQ	36
3.1.1.4. Producción de $\cdot\text{OH}$ por <i>C. rigida</i> vía ciclo redox de la DBQ.....	37
3.1.1.4.1. Efecto de la concentración de lacasa .....	38
3.1.1.4.2. Efecto del pH y de la naturaleza del tampón.....	39
3.1.1.4.3. Efecto de agentes promotores de la oxidación de 2,6-DBQH <sub>2</sub> y la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
3.1.2. <i>Gloeophyllum trabeum</i> .....	44
3.1.2.1. Producción de quinonas implicadas en la producción de EROs por <i>G. trabeum</i> ...	44
3.1.2.2. Autooxidación de la 2,5-dimetoxibenzohidroquinona .....	44
3.1.2.3. Efecto del Mn <sup>2+</sup> sobre la producción de elementos necesarios para el establecimientos de ciclos redox de quinonas en <i>G. trabeum</i> .....	46
3.1.2.3.1. Crecimiento del hongo y producción de quinona reductasa.....	46
3.1.2.3.2. Producción oxalato y del par redox 2,5-DBQH <sub>2</sub> /DBQ.....	47
3.1.2.3.3. Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en los cultivos.....	48
3.1.2.3.4. Producción de $\cdot\text{OH}$ en los cultivos .....	51
3.1.2.4. Evaluación del efecto de Mn <sup>3+</sup> sobre el ciclo redox de la 2,5-DBQ y la activación del oxígeno en incubaciones realizadas con micelio lavado de <i>G. trabeum</i> .....	51
3.1.2.4.1. Producción del reactivo de Fenton.....	51
3.1.2.4.2. Producción de $\cdot\text{OH}$ .....	53
3.1.3. <i>A. nidulans</i> .....	56
3.1.3.1. Crecimiento y expresión de enzimas implicadas en los ciclos redox de quinonas	56
3.1.3.2. Activación del oxígeno por <i>A. nidulans</i> .....	56
3.1.3.2.1. Producción de TBARS mediante ciclos redox de 2,6-DBQ.....	56

3.1.3.2.2. Efecto del pH y del quelante del hierro sobre la oxidación de la 2,6-DBQH <sub>2</sub> .....	59
3.1.3.2.3. Ciclo redox de la 2,6-DBQH <sub>2</sub> .....	61
3.1.3.3. Determinación de los componentes del reactivo de Fenton.....	62
3.1.3.3.2. Reducción de Fe <sup>3+</sup> mediante el ciclo redox de la 2,6-DBQ. ....	63
3.1.3.3.3. Hidroxilación de ácido 4-hidroxibenzoico. ....	64
3.1.3.4. Determinación de las condiciones óptimas de producción de radicales ·OH.....	64
3.1.3.4.1. Efecto del pH y la temperatura.....	64
3.1.3.4.2. Determinación de la concentración óptima de micelio .....	66
3.1.3.4.3. Selección de quinona y concentración óptima de la misma .....	66
3.1.3.4.4. Velocidad de degradación de la 2,6-DBQ .....	68
3.1.4. <i>Penicillium oxalicum</i> .....	70
3.1.4.1. Determinación de las condiciones de cultivo para la producción de radicales hidroxilo. ....	70
3.1.4.2. Influencia de la biomasa sobre la producción de radicales hidroxilo. ....	71
3.1.4.3. Hidroxilación de ácido 4-Hidroxibenzoico por <i>P. oxalicum</i> . ....	71
3.1.4.4. Consumo de DBQ por <i>P. oxalicum</i> . ....	73
3.1.5. <i>Pseudomonas putida</i> .....	74
3.1.5.1. Cultivo de <i>P. putida</i> .....	74
3.1.5.2. Actividad quinona reductasa en <i>P. putida</i> .....	74
3.1.5.3. Producción de radicales ·OH en <i>P. putida</i> .....	75
3.1.5.3.1. Influencia de la edad del cultivo sobre el ciclo redox de quinonas en <i>P. putida</i> .....	76
3.1.5.3.2. Efecto de la biomasa en la producción de radicales ·OH.....	77
3.1.6. <i>Escherichia coli</i> .....	79
3.1.6.1. Cultivo de <i>E. coli</i> .....	79
3.1.6.2. Actividad quinona reductasa en <i>E. coli</i> .....	79
3.1.6.3. Producción de radicales ·OH en <i>E.coli</i> .....	81
3.1.6.3.1. Influencia de la edad del cultivo sobre la producción de ·OH en <i>E. coli</i> .....	81
3.1.6.3.2. Efecto de la biomasa en la producción de radicales ·OH.....	82
3.1.6.3.3. Degradación de 2,6-DBQ .....	83
3.1.6.3.4. Efecto de la producción de ·OH sobre la viabilidad de <i>E. coli</i> .....	84
3.2. Potencial degradativo de <i>C. rigida</i> .....	86
3.2.1. Lacasa in vitro .....	86
3.2.2. Selección de mediadores de la lacasa .....	88
3.2.2.1. Determinación de sustratos de la lacasa .....	89
3.2.2.2. Identificación de compuestos mediadores.....	91

3.2.2.3. Determinación de la concentración óptima de mediador.....	93
3.2.3. Evaluación in vitro del sistema lacasa-mediador.....	93
3.2.3.1. Degradación de colorantes por el sistema lacasa-siringaldehído.....	93
3.2.3.2. Degradación de ácido homoverátrico por el sistema lacasa-mediador .....	96
3.2.4. Degradación in vivo mediante el sistema lacasa-mediador de <i>C. rigida</i> .....	98
3.2.4.1. Degradación de colorantes mediante el sistema lacasa-siringaldehído.....	98
3.2.5. Biooxidación avanzada de colorantes. ....	100
3.2.5.1. Biooxidación avanzada de colorantes a pH 5 .....	100
3.2.5.2. Biooxidación avanzada de colorantes a pH 7 .....	101
3.3. Biooxidación avanzada de contaminantes por <i>A. nidulans</i> .....	104
3.3.1. Degradación de colorantes textiles .....	104
3.3.2. Degradación de fármacos y disruptores endocrinos .....	108
3.4. Biooxidación avanzada de contaminantes emergentes por <i>P. oxalicum</i> .....	113
3.5. Biooxidación avanzada de colorantes y fármacos por <i>Escherichia coli</i> .....	116
3.5.1. Colorantes.....	116
3.5.2. Fármacos.....	117
3.6. Reutilización del hongo en tandas sucesivas de oxidación avanzada .....	119
3.6.1. <i>Trametes versicolor</i> .....	119
3.6.1.1. Tiempo de cultivo y cantidad óptima de micelio para la producción de $\cdot\text{OH}$ .....	119
3.6.1.2. Efectos de los ciclos redox de quinona en la viabilidad de <i>T. versicolor</i> .....	120
3.6.1.3. Reutilización del micelio en tandas sucesivas de producción de radicales $\cdot\text{OH}$ ..	121
3.6.1.4. Degradación de carbamazepina en tandas sucesivas de oxidación avanzada ....	124
3.6.2. <i>Aspergillus nidulans</i> .....	130
3.6.2.1. Efectos de los ciclos redox de quinona en la viabilidad de <i>A. nidulans</i> . ....	130
3.6.2.2. Reutilización del micelio en tandas sucesivas de producción de radicales $\cdot\text{OH}$ ..	130
3.6.2.3. Degradación de New Coccine en tandas sucesivas de oxidación avanzada .....	132
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	1336
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	1339

# **1. INTRODUCCION**



### 1.1. EL PROBLEMA ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS

“El agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal”. En base a dicha consideración se estableció la directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, con objeto de detener el deterioro de las masas de agua de la Unión Europea. Entre algunos de los objetivos particulares de la directiva cabe señalar el que busca una mayor protección y mejora del medio acuático y destaca entre otras formas mediante la adopción de medidas específicas de reducción progresiva, la interrupción o la supresión gradual de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias. En ese sentido se desarrolló la directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, que modifica la directiva anterior y expone que la contaminación química de las aguas superficiales representa una amenaza para el medio acuático con efectos tales como toxicidad aguda y crónica para los organismos acuáticos, acumulación en el ecosistema y pérdidas de hábitats y de biodiversidad, así como para la salud humana. Es preciso identificar las causas de la contaminación y tratar las emisiones preferentemente en la fuente misma, de la forma más eficaz en términos económicos y ambientales. La última modificación de esta legislación fue la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo en la que se actualizan las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas y se plantea la necesidad de detectar y valorar los riesgos para la salud de los denominados contaminantes emergentes, que define como aquellos contaminantes que en la actualidad no están incluidos en los programas de seguimiento sistemático en la Unión, pero que suponen un importante riesgo, lo cual exige su regulación, dependiendo de sus posibles efectos ecotoxicológicos y toxicológicos, y de sus niveles en el medio acuático.

Entre los contaminantes emergentes se encuentran, entre otros, disruptores endocrinos, fármacos y otros productos de cuidado personal (derivados de cremas, perfumes, etc.), cuya regulación no existe o no está completamente desarrollada. La preocupación sobre su efecto sobre el medio ambiente se basa en la naturaleza bioactiva de dichas sustancias, así como de los metabolitos derivados de éstas, cuyas formas de actuación no son conocidas en muchas ocasiones (Daughton y Ternes, 1999). Si bien todavía son necesarios estudios que determinen los efectos de los contaminantes emergentes, se ha demostrado su relación con problemas de crecimiento y fertilidad, así como de feminización en algunas especies (Jackson y Sutton, 2008; Pal et al., 2010). En humanos, por otra parte, se han relacionado con problemas de desarrollo de órganos durante el embarazo o en edades tempranas (Lyche et al., 2011).

El problema para tratar de eliminar estos compuestos comienza con las dificultades para su detección. Esto es debido, en primer lugar, a la baja concentración en la que se encuentran, lo que hizo que pasasen desapercibidos hasta los años 90 (Halling-Sorensen et al., 1998). En segundo lugar, la detección también se ve dificultada por su variabilidad, lo que hace que no existan protocolos ni legislación específica sobre muchos de ellos (Daughton y Ternes, 1999; Petrovic et al., 2003). Por ello, los investigadores se han centrado en el desarrollo de técnicas de alta resolución para su separación e identificación, basadas en la cromatografía líquida o de gases, acopladas a espectrometría de masas. La descarga de estos compuestos sobre las aguas ocurre de forma continua a través de las aguas de escorrentía y de los sistemas de aguas residuales domésticos e industriales (Daughton y Ternes, 1999), puesto que los tratamientos convencionales aplicados en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) resultan insuficientes para su eliminación (Gerzabek et al., 2007; Gil et al., 2012; Pal et al., 2010). Este problema se debe a que el principal proceso que se aplica para la eliminación de compuestos contaminantes en las EDAR son tratamientos biológicos como los fangos activos, en los que la microbiota se ha adaptado para degradar los contaminantes habitualmente presentes en las aguas que tratan. Sin

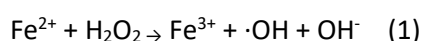
embargo, en el caso de fármacos u otros contaminantes emergentes el desarrollo de nuevos compuestos es continuo lo que conlleva que en muchos casos la adaptación de la microbiota presente a dichos compuestos resulte mucho más difícil. En otras ocasiones dicha adaptación puede existir, pero dada la baja concentración de los contaminantes emergentes no se alcanzan los límites inferiores de afinidad de las enzimas implicadas en su eliminación (Daughton y Ternes, 1999). Por todo ello la investigación se centra en el desarrollo de procesos físicos, químicos, biológicos o combinaciones de éstos que puedan ser aplicados como tratamientos terciarios. En este sentido cabe destacar los procesos de oxidación avanzada (POA), descritos en el apartado 1.2 de la Introducción.

Otro grupo de contaminantes que puede tener grandes efectos negativos sobre los ecosistemas acuáticos son los colorantes textiles. A diferencia de los contaminantes emergentes descritos previamente, éstos tienen un origen más puntual, puesto que su vertido se produce principalmente en la industria textil, donde entre el 10-15% del colorante utilizado se pierde y pasa a formar parte de los efluentes del proceso (Baban et al., 2003). Si dichos efluentes no son tratados correctamente pueden alterar parámetros del agua como el pH o la demanda biológica de oxígeno (DBO) (Puvaneswari et al., 2006) y causar un fuerte impacto visual, impidiendo también el paso de luz y por lo tanto la fotosíntesis (Forss y Welander, 2011). Además, el grupo más común de colorantes, los azo, que incluye el 70% de los colorantes empleados en la industria textil (Lade et al., 2015), y algunos de sus productos de ruptura pueden ser irritantes, tóxicos por inhalación o consumo, mutagénicos y cancerígenos (Nikulina et al., 1995), especialmente cuando los grupos azo sufren procesos de reducción generándose aminas aromáticas (Lade et al., 2015). Algunas de las estrategias estudiadas para su eliminación incluyen procesos fisicoquímicos de adsorción, coagulación (Chen et al., 2013), POA, como por ejemplo reacciones tipo Fenton y electrofenton u ozonización (Guivarch et al., 2003; Hsueh et al., 2005; Shu y Huang, 1995) y procesos biológicos (Lade et al., 2015). Dentro de los procesos biológicos cabe destacar los procesos llevados a cabo con hongos ligninolíticos (Forss y Welander, 2011) y/o sus enzimas (Cañas y Camarero, 2010), que se ofrecen como una alternativa para la eliminación de colorantes textiles respetuosa con el medio ambiente gracias a la alta capacidad degradativa de estos organismos y a la baja especificidad de sustrato de sus enzimas, que serán tratadas con mayor profundidad en el apartado 1.3 de la introducción.

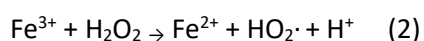
## 1.2. PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA (POA)

Los POA son un conjunto de tecnologías físico-químicas basadas en la generación de radicales muy reactivos, principalmente hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Gracias a su elevado potencial de reducción (2,8 V), dichos radicales oxidan casi todo compuesto orgánico con el que colisionan y, producidos en grandes cantidades, pueden eliminar todos los contaminantes presentes en las aguas llegando incluso a mineralizarlos (Pera-Titus et al., 2004; Torrades et al., 2004).

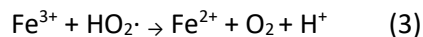
Entre el tipo de estrategias degradativas que se incluyen en los POA, cabe señalar: la reacción de Fenton, ozonización, fotocátalisis con  $\text{TiO}_2$ , fotólisis de agua, la aplicación de luz ultravioleta (UV), ultrasonidos (US) o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que a su vez tienen un gran número de modalidades, siendo posible la combinación de ellas ( $\text{O}_3 + \text{UV}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{US}$ , etc) (Mohapatra et al., 2014; Oturan y Aaron, 2014). La más común de todas es la reacción de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ ), que genera  $\cdot\text{OH}$  mediante en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por  $\text{Fe}^{2+}$  tal y como se indica a continuación:



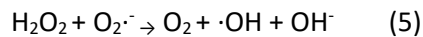
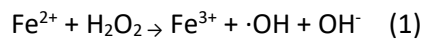
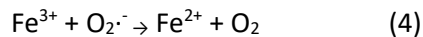
A pH cercano a 3, esta reacción puede propagarse por la acción catalítica del par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  a través de la reacción:



Si bien ésta es mucho más lenta que la reacción de Fenton. Otras formas de reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  más efectivas son las llevadas a cabo por  $\text{HO}_2\cdot$ :

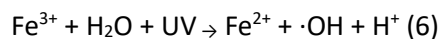


O por  $\text{O}_2\cdot^-$  dando lugar a la reacción de Haber-Weiss que incluye la reacción de Fenton (reacción 1):



Entre las ventajas que presenta la reacción de Fenton cabe destacar la facilidad de implementación en plantas de tratamiento ya existentes debido a la flexibilidad y simplicidad del proceso, la ausencia de requerimientos energéticos y los bajos costes de los reactivos (Bautista et al., 2008). En cuanto a las desventajas se encuentran la necesidad de pH ácido o la formación de lodos como resultado de la desactivación y precipitación de hierro (Tarr et al., 2004). Sin embargo existen además numerosas variaciones del proceso que permiten potenciar algunas de sus ventajas y/o solventar las desventajas como es el caso del Fenton heterogéneo donde el Fe no se encuentra disuelto y se utiliza, por ejemplo, un soporte como sílica o resinas para los iones (Liou et al., 2005; Navalon et al., 2010). Otras modificaciones de este proceso añaden una fuente energética como el foto-Fenton, electro-Fenton y sono-Fenton.

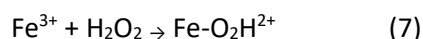
Los procesos conocidos como **foto-Fenton** combinan el uso de luz UV con el reactivo de Fenton. La luz UV actúa generando  $\cdot\text{OH}$  directamente al descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y también estimula la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$ , reduciendo su pérdida por precipitación e incrementando la producción de  $\cdot\text{OH}$  según la reacción:



Además, la luz UV puede ser capaz de eliminar intermediarios de reacción aumentando la eficiencia del proceso. Como contrapartida se encuentra el aumento de los costes del proceso por la inclusión de la luz UV. Este proceso se considera uno de los más eficientes y se ha estudiado en degradación de pesticidas (Bouafia-Chergui et al., 2010; Diagne et al., 2009), antibióticos (Perez-Moya et al., 2010), colorantes (Macias-Sanchez et al., 2011; Maezono et al., 2011) y clorofenoles (Pupo Nogueira y Guimaraes, 2000).

Las reacciones de **electro-Fenton** se caracterizan por la electrogeneración *in situ* de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la regeneración del  $\text{Fe}^{2+}$  en el cátodo de una célula electrogénica. El proceso puede llevarse a cabo en células separadas o unidas, produciéndose en este último caso  $\cdot\text{OH}$  por oxidación de  $\text{H}_2\text{O}$  en el ánodo (Oturán y Aaron, 2014).

Los POA de **sono-Fenton** combinan el uso del reactivo de Fenton y ultrasonidos (US). El principal efecto de los US sobre el reactivo de Fenton es favorecer la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a través de su reacción con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reacción 2) en la serie de etapas de reacción que se presenta a continuación (Neppolian et al., 2002):



Finalmente se ha estudiado también la posibilidad de sustituir el Fe por otros iones metálicos en las conocidas como reacciones tipo Fenton libres de hierro (Bokare y Choi, 2014), en las que el Fe se sustituye por otros elementos con varias formas redox que pueden dar lugar a la formación de  $\cdot\text{OH}$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entre los elementos que pueden sustituir al Fe se encuentran iones metálicos



como Cu, Al, Co, Mn, etc. Estos permiten solventar algunas de las limitaciones del reactivo de Fenton como la necesidad de pH ácido, si bien presentan sus propias limitaciones, haciendo necesaria la selección de aquel que más se adecue a las condiciones del efluente a tratar.

A pesar de la efectividad de los POA, su uso se ve limitado a aguas contaminadas con baja carga orgánica, ya que la alta reactividad y baja selectividad de los radicales  $\cdot\text{OH}$  requiere que sean producidos de manera continua en grandes cantidades, de modo que el consumo de energía y reactivos es muy elevado. Por esta razón, los POA se están investigando como pretratamiento de procesos biológicos (mucho más baratos), en cuyo caso una oxidación parcial que conduzca a la disminución de la toxicidad de los contaminantes y al aumento de su biodegradabilidad sería suficiente (Chamarro et al., 2001; Marco et al., 1997; Oller et al., 2011; Pulgarin et al., 1999), si bien la alternativa más aceptada consiste en emplear un tratamiento biológico previamente a los POA a fin de disminuir la carga orgánica (Ikehata et al., 2008; Oller et al., 2011; Scott y Ollis, 1995). Es importante conocer las características del agua a tratar mediante análisis biológicos y químicos a la hora de diseñar la combinación de procesos más adecuada para el tratamiento de un determinado efluente, tal y como se ilustra en la figura 1 para aguas industriales con diferentes cargas orgánicas. Si la toxicidad es alta se propone un tratamiento con POA hasta conseguir que esta sea biodegradable, para a continuación aplicar un tratamiento biológico. En el caso de toxicidad baja o nula se diluye si el carbono orgánico total es superior a 500 mg/ml y se aplican POA únicamente con compuestos no biodegradables.

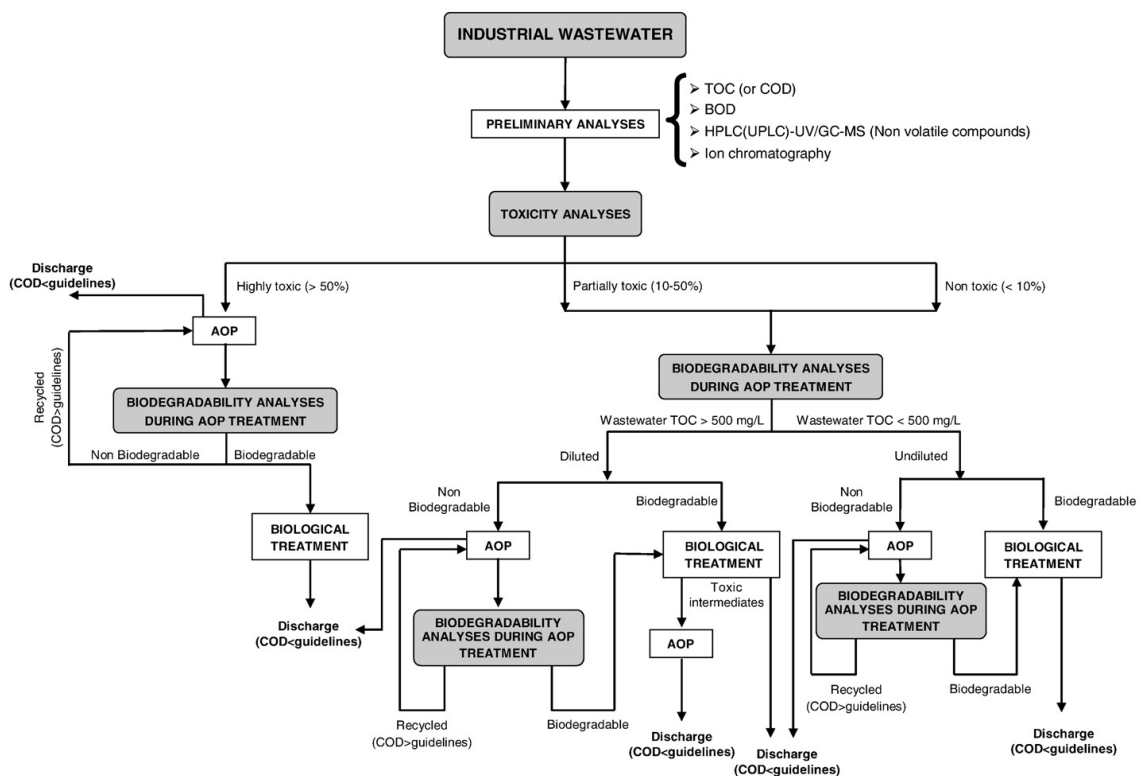


Figura 1. Esquema de combinación de tratamiento biológico para aguas industriales tóxicas o no biodegradables (Oller et al., 2011)

Una alternativa que fusiona en un solo proceso los tratamientos biológicos y de oxidación avanzada los constituyen los denominados procesos de biooxidación avanzada (PBOA) en los que se induce en microorganismo la producción extracelular de radicales  $\cdot\text{OH}$  y se describe en profundidad en el apartado 1.4 de la introducción.

### 1.3. POTENCIAL DEGRADATIVO DE LOS HONGOS LIGNINOLÍTICOS

El interés en el uso de hongos ligninolíticos en procesos biológicos de descontaminación se basa en su capacidad para degradar una gran cantidad y variedad de compuestos contaminantes tóxicos, como hidrocarburos aromáticos (incluidos los policíclicos, PAH), explosivos, pesticidas, dioxinas, bifenilos policlorados, colorantes textiles, etc., llegando incluso a mineralizarlos (Barr y Aust, 1994; Bumpus et al., 1985; Niemann et al., 1993; Wesenberg et al., 2003). Dicha capacidad se debe a las similitudes estructurales de estos compuestos y la lignina, principalmente su naturaleza aromática, a la baja especificidad de sustrato de las enzimas implicadas en el proceso (lacasas y peroxidasas) y a la producción de agentes oxidantes de bajo peso molecular y elevado potencial redox, que incrementa notablemente el rango de compuestos susceptibles de degradación (Evans et al., 1994). Estos agentes incluyen radicales de metabolitos fúngicos y productos de la degradación de la lignina (denominados mediadores) (Camarero et al., 2005; Johannes y Majcherczyk, 2000), iones metálicos oxidados ( $Mn^{3+}$ ) (Gold et al., 2000; Martínez, 2002), y radicales libres de oxígeno (RLO: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y radicales peroxilo ( $RO_2^{\cdot}$ ) y alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ) derivados de la peroxidación de ácidos grasos insaturados) (Hammel et al., 2002).

#### 1.3.1. Estructura de la lignina

La alta capacidad degradativa de los hongos ligninolíticos se debe a los sistemas que han desarrollado para actuar sobre la lignina. Ésta, junto con la celulosa y la hemicelulosa, constituyen los componentes mayoritarios de las paredes celulares vegetales. Se trata de un polímero aromático muy heterogéneo formado por tres unidades de fenilpropano que se unen por más de diez tipos de enlaces diferentes de tipo éter y carbono-carbono (Fengel y Wegener, 1984; Sjöström, 1993). La lignina presenta una gran variabilidad estructural, que no sólo depende de la especie y tejido, sino también del tipo de célula. Esta heterogeneidad se debe a su complicado mecanismo de síntesis (Higuchi, 1985) y es precisamente su complejidad estructural el factor que limita la actuación de los sistemas enzimáticos conocidos (Flournoy et al., 1993).

Los precursores de las unidades de lignina son tres alcoholes cinamílicos (3-fenil-2-propen-1-ol), denominados cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico). Estos alcoholes dan lugar respectivamente a las unidades 4-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) de la lignina. En la figura 2 se presenta la estructura de los tres alcoholes cinamílicos y de un modelo de lignina de angiospermas (Adler, 1977). Los enlaces más frecuentes en la lignina son de tipo aril-éter, de los cuales el  $\beta$ -O-4 representa el 40-60% del conjunto de enlaces, lo que hace que el contenido fenólico de la lignina sea muy bajo (Camarero et al., 1994; Nimz, 1974). El enlace  $\beta$ -O-4 se encuentra representado varias veces en el modelo de lignina de la figura 2, por ejemplo, entre las unidades 1-2 y 13-14. Otros enlaces característicos, que individualmente no suelen sobrepasar el 10%, son el  $\beta$ -1 (unidades 8-9), el  $\beta$ - $\beta$  (unidades 10-11), el 5-5 (unidades 5-6), el 4-O-5 (unidades 8-10), etc.

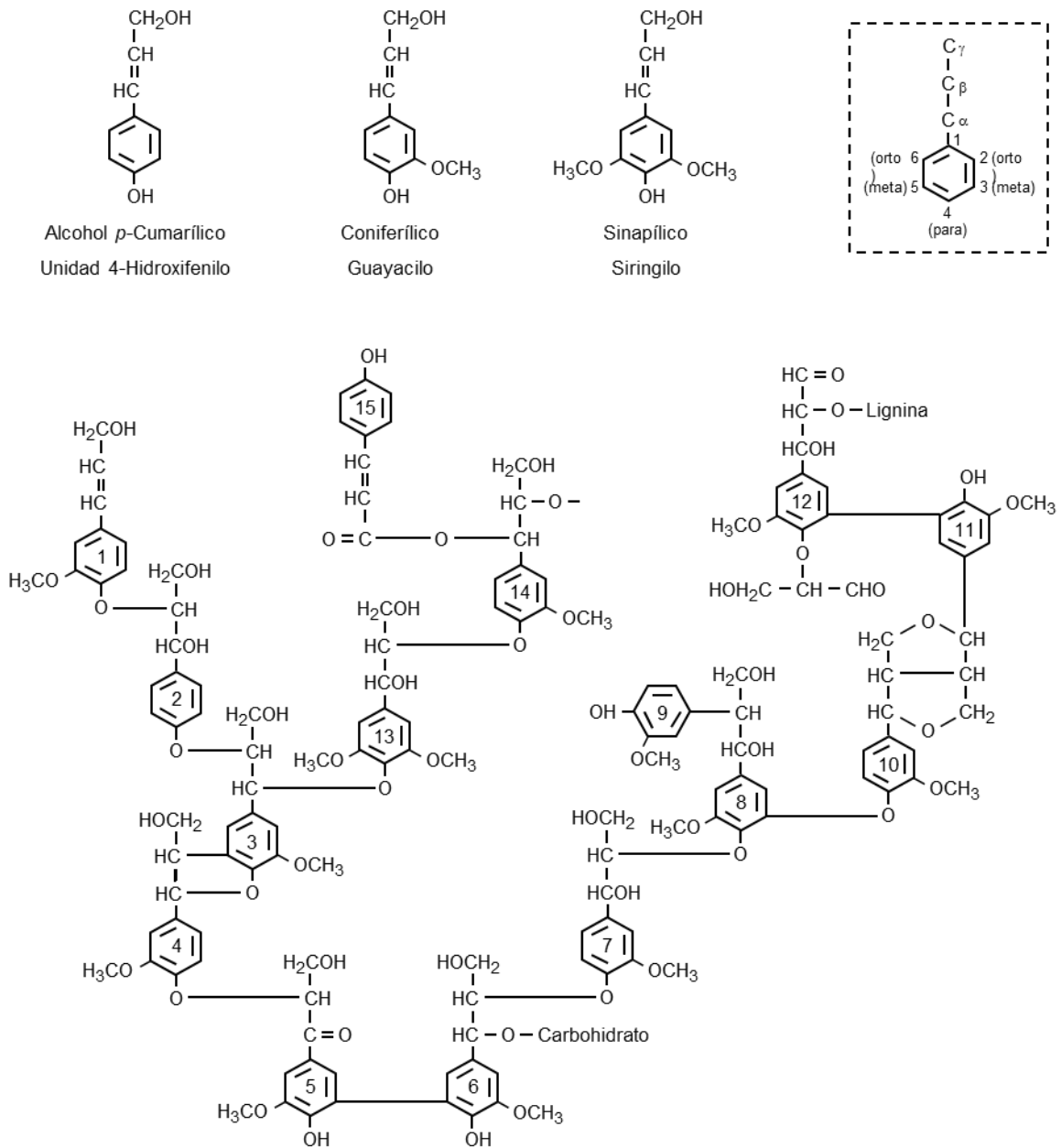


Figura 2. Alcoholes precursores de la lignina y modelo estructural del polímero, basado en el propuesto por Adler (1977). En la unidad de fenilpropano delimitada por un recuadro se indica la numeración y nombres de los átomos de carbono.

La lignina ejerce un papel protector de los polisacáridos de la pared vegetal y cuando alcanza una proporción elevada en relación al resto de los componentes (alrededor del 20%), la resistencia a la degradación se extiende a la totalidad del material. Es precisamente su complejidad estructural, tal y como se ha comentado anteriormente, caracterizada por su naturaleza aromática, bajo contenido fenólico y alto contenido en unidades no fenólicas, unido a la estructura compacta que forma junto a los demás componentes de la lignocelulosa, lo que hace que sea tan resistente a la degradación, limitando el acceso a los sistemas enzimáticos. De hecho, estudios de inmunolocalización de enzimas han demostrado que hasta que no se alcanzan estadios avanzados de degradación, no se detecta la presencia de dichas enzimas en el interior de la pared celular vegetal (Daniel et al., 1988).

La resistencia de la lignina a la degradación y la imposibilidad de que las enzimas puedan penetrar en la lignocelulosa nativa, ha resultado desencadenante para la búsqueda de sistemas de

oxidación indirectos de las enzimas ligninolíticas, basados en la producción de agentes oxidantes de bajo peso molecular y alto potencial redox que pudieran penetrar en la matriz lignocelulósica y ampliar el radio de acción a las unidades no fenólicas de la lignina. Entre los agentes oxidantes descritos hasta la fecha se encuentran los radicales de ciertos metabolitos aromáticos de hongos, como el alcohol veratrílico (Harvey et al., 1986), la forma oxidada de iones metálicos presentes en la lignocelulosa como el  $Mn^{3+}$  (Gold et al., 2000), radicales libres de oxígeno como los  $\cdot OH$  (Joseleau et al., 1994) y radicales peroxilo ( $ROO\cdot$ ), derivados estos últimos de la peroxidación de lípidos (Hammel et al., 2002)

La degradación de la lignocelulosa es un proceso natural de reciclado de la materia orgánica en el que intervienen diferentes tipos de organismos procariotas (bacterias, arqueas) y eucariotas (animales y hongos) (Cragg et al., 2015). Recientes estudios metagenómicos han revelado la complejidad y variedad de la actividad degradativa mediada por procariotas en ambientes ricos en lignocelulosa. La mayoría de las bacterias capaces de oxidar la lignina pertenecen a los *phyla Actinobacteria*,  *$\alpha$ -Proteobacteria* y  *$\gamma$ -Proteobacteria*, siendo peroxidasas y lacasas las enzimas principalmente implicadas en la degradación de la lignina por bacterias (Cragg et al., 2015). Aunque aún se tiene escaso conocimiento de los mecanismos de degradación de lignina en arqueas, se han descubierto cinco genes codificantes de lacasa a los que podría atribuirse la oxidación de lignina en estos microorganismos (Riley et al., 2014). Por otro lado, la actividad ligninolítica que caracteriza a algunos invertebrados es fruto de la simbiosis con bacterias que habitan en su tracto intestinal, si bien recientemente han sido descritas enzimas con actividad fenoloxidasas en crustáceos cuyo tracto intestinal carecía de bacterias (Cragg et al., 2015).

A pesar de la gran variedad de organismos con actividad ligninolítica, la colonización de la lignocelulosa en la naturaleza se produce principalmente por hongos basidiomicetos, mayoritariamente pertenecientes al orden Polyporales, seguido en eficacia por ascomicetos. Tradicionalmente se ha dividido a los hongos basidiomicetos en hongos de podredumbre blanca y parda, atendiendo al color que adquiere la madera colonizada por ambos grupos (Riley et al., 2014).

### **1.3.2. Hongos de podredumbre parda**

Los hongos de podredumbre parda son hongos basidiomicetos que se caracterizan por la rapidez con la que degradan la madera, consumiendo los polisacáridos que la componen y dejando un residuo parduzco compuesto principalmente por lignina modificada. La velocidad con la que son capaces de degradar la madera ha llevado al desarrollo de una extensa literatura dedicada a la prevención de sus efectos sobre las actividades humanas que emplean la madera, especialmente las construcciones (Simonsen et al., 2004; Viitanen, 1994). El mecanismo de acción de estos hongos se realiza en dos etapas: la primera de ellas, de carácter oxidativo, está mediada por los radicales libres de oxígeno (RLO, principalmente  $\cdot OH$ ) y a través de ella se consigue una modificación en la estructura de la lignina, que permite el acceso a las celulasas y hemicelulasas, enzimas implicadas en la obtención de azúcares a partir de la celulosa y la hemicelulosa, respectivamente (Arantes et al., 2012), lo que constituye la segunda etapa denominada sacarificación enzimática. El mecanismo de producción de  $\cdot OH$  que utilizan los hongos de podredumbre parda se basa en la reacción de Fenton (Apartado 1.2)

Para que la reacción de Fenton se produzca, es necesario en primer lugar, la solubilización del  $Fe^{3+}$  que se encuentra presente en el lumen celular, unido a componentes de las paredes vegetales y/o en forma de óxidos e hidróxidos insolubles (Goodell et al., 1997a; Goodell, 2003; Xu y Goodell, 2001). Este papel se atribuye al ácido oxálico, que es producido por los hongos de podredumbre parda y se une al metal formando el complejo  $Fe^{3+}$ -oxalato. Los hongos de podredumbre parda producen oxalato en una alta concentración con la consecuente acidificación del entorno circundante a las hifas, favoreciéndose la formación de dicho complejo puesto que la formación del mismo se ve influenciada por el pH de tal forma que a pHs ácidos, el oxalato

presenta una elevada afinidad por el Fe (Arantes et al., 2012). Además, el ácido oxálico, hace que se establezca un diferencial de pH desde 2,5 en torno a las hifas, hasta 4,5-5,0 en la pared celular. Este diferencial de pH es importante porque regula la localización de algunas de las reacciones implicadas en la producción de  $\cdot\text{OH}$ . Diversos trabajos han propuesto que estos complejos difunden desde el lumen hasta las paredes celulares donde el pH es superior. A valores de pH entre 4,5-5,0, la afinidad por el  $\text{Fe}^{3+}$  de diferentes agentes quelantes y reductores es mayor que la del oxalato. Se consigue así la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  y la consecuente producción de  $\text{Fe}^{2+}$  necesario para la formación del reactivo de Fenton (Arantes et al., 2012; Xu y Goodell, 2001).

Entre los agentes implicados en la reducción de los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  se encuentran glicopéptidos, producidos por *Ghloeopylum trabeum* y *Tyromyces palustris* (Enoki et al., 2003; Xu y Goodell, 2001), la celobiosa deshidrogenasa (CDH) como es el caso de *Coniophora puteana* (Hyde y Wood, 1997) y compuestos derivados del hidroxibenceno. Estos compuestos han sido aislados en cultivos de diferentes hongos, principalmente *G. trabeum*, y entre ellos se encuentran diversas hidroquinonas como la 2,5-dimetoxibenzohidroquinona (2,5-DBQH<sub>2</sub>) (Goodell et al., 1997b) o 4,5-dimetoxicatecol (Paszczynski et al., 1999).

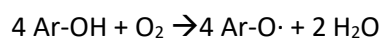
Finalmente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  requerido para producir  $\cdot\text{OH}$  mediante el reactivo de Fenton puede ser generado a partir de la oxidación de metanol por acción de las enzimas metanol y alcohol oxidasa detectadas en algunas especies de hongos de podredumbre parda (Daniel et al., 2007; Martínez et al., 2009). Un segundo mecanismo por el que se produce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  necesario para el establecimiento de la reacción de Fenton está asociado a los mecanismos de reducción del  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato descritos anteriormente. Por ejemplo, en la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato por la QH<sub>2</sub> se produce un radical semiquinona que al autooxidarse en su correspondiente quinona reduce al  $\text{O}_2$ , generando  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Este  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dismuta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  que junto al  $\text{Fe}^{2+}$ -oxalato producido, genera  $\cdot\text{OH}$  mediante el reactivo de Fenton. En la bibliografía este mecanismo se ha denominado reacción de Fenton mediada por quelante (Goodell et al., 1997b; Goodell et al., 2006), ciclo redox de hidroquinonas (Suzuki et al., 2006; Yelle et al., 2008) y reacción de Fenton dirigida por dihidroxibenceno (Rodríguez et al., 2001).

### 1.3.3. Hongos de podredumbre blanca

Los hongos de podredumbre blanca se caracterizan por su capacidad para degradar eficazmente todos los componentes de la madera, incluido la lignina. Para ello poseen un sistema ligninolítico integrado por varios tipos de enzimas (lacasas y peroxidasas), cuya capacidad de oxidar la lignina incluye un modo de acción directo y otro indirecto. Este último implica la producción de agentes ligninolíticos de bajo peso molecular y alto potencial redox, entre los que se encuentran los RLO (Hammel et al., 2002), que juegan un papel fundamental en la alteración inicial de la estructura de la lignocelulosa, requerida para la penetración de las enzimas degradativas.

#### 1.3.3.1. Lacasas

La lacasa (bencenodiol:dioxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) es una enzima de la familia de las oxidorreductasas multicobre (MCOs) con actividad fenoloxidasa que cataliza la oxidación monovalente de las unidades fenólicas de la lignina y de los compuestos fenólicos que se producen durante su degradación (alcoholes, aldehídos, ácidos e hidroquinonas), así como de una gran variedad de otros compuestos fenólicos y aminas aromáticas. La estequiometría de la reacción sobre compuestos aromáticos fenólicos (Ar-OH) responde a la siguiente ecuación:



El hecho de que la lacasa no presente actividad sobre compuestos aromáticos no fenólicos depende más del potencial redox de estos compuestos (superior que el de los fenólicos) que a una falta de afinidad de la enzima. En este sentido, se ha comprobado que las lacasas de

diferentes hongos poseen distintos potenciales redox, y que existe una correlación positiva entre éstos y el número y variedad de compuestos que pueden oxidar (Xu et al., 1996).

Se ha demostrado que la acción concertada de la lacasa y compuestos oxidables de bajo peso molecular extiende la acción oxidativa de la enzima a compuestos aromáticos no fenólicos (Bourbonnais y Paice, 1990), denominándose a dichos compuestos como mediadores. Estos podrían además explicar cómo algunos hongos que sólo producen lacasa, como por ejemplo *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996) y *Coriolopsis rigida* (Saparrat et al., 2002) son eficaces colonizando madera y degradando lignina. El primer compuesto fenólico con el que se demostró que la lacasa podía oxidar indirectamente compuestos aromáticos no fenólicos fue un producto de degradación de la lignina, el siringaldehído, aunque su acción como mediador no fue muy eficaz (Kawai et al., 1989; Wariishi et al., 1987). Poco después, Bourbonnais y Paice (1990) comprobaron que sustratos artificiales de la enzima, como el ABTS, también podían actuar como mediadores. Estos hallazgos suscitaron un interés tan grande en sectores industriales, principalmente el papelerero, que actualmente son numerosos los mediadores artificiales de la enzima que se conocen (Call y Mücke, 1997). Sin embargo, los mediadores artificiales presentan varias desventajas frente a productos naturales, como su elevado coste y toxicidad (Cañas y Camarero, 2010). Por esta razón otros estudios se han centrado en la búsqueda de mediadores naturales. Como ejemplo de compuestos naturales que han mostrado una alta eficacia en la degradación de PAHs, cabe mencionar al ácido 4-hidroxibenzoico y el alcohol 4-hidroxibencílico en reacciones catalizadas por la lacasa de *Trametes versicolor* (Johannes y Majcherczyk, 2000), y el siringaldehído y la acetosiringona con la lacasa de *P. cinnabarinus* (Cañas et al., 2007). A pesar de la alta eficacia de estos mediadores naturales, una de las principales limitaciones que presentan es que su concentración disminuye más o menos rápido debido a la oxidación de su forma radicalica a productos que se acumulan en las mezclas de reacción.

Entre los compuestos contaminantes que pueden ser oxidados directamente por lacasas de diferentes hongos se encuentran algunos PAHs, pesticidas organofosforados, colorantes textiles, clorofenoles, herbicidas, disruptores endocrinos, anti-inflamatorios, etc (Baldrian, 2006; Majeau et al., 2010; Mayer y Staples, 2002).

### 1.3.3.2. Peroxidasas

Dentro de las peroxidasas se incluyen las siguientes enzimas: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa versátil (VP) y las recientemente descritas peroxidasas decolorantes de tintes (DyP) y peroxigenasas aromáticas (APO). Todas ellas requieren  $H_2O_2$  para el establecimiento de su ciclo catalítico. La diferencia entre la LiP y la MnP radica en su forma de actuar sobre las unidades fenólicas de la lignina. Mientras que la LiP las oxida directamente (Martínez, 2002), la MnP lo hace a través de la generación de  $Mn^{3+}$  (Jensen et al., 1996). La VP combina las características catalíticas de la LiP y la MnP. La función fisiológica de las DyP no se conoce con exactitud, pero se sabe que su actividad es bifuncional al tener actividad oxidativa e hidrolítica (Colpa et al., 2014). Estas enzimas se caracterizan por su capacidad para degradar colorantes de diferentes tipos, en especial los de tipo antraquinona. Sobre los colorantes de tipo azo, sin embargo, presentan baja actividad. En recientes estudios se ha observado su capacidad para degradar lignina (Ahmad et al., 2011). Las APO pertenecen al grupo de las hemo-tiolato peroxidasas y fueron descubiertas por primera vez durante la degradación de madera por el hongo *Agrocybe aegerita*. Posteriormente su actividad ha sido detectada en cultivos de diversos basidiomicetos (Hofrichter et al., 2010). Se caracterizan por oxidar eficientemente diversos compuestos alifáticos y aromáticos como el alcohol veratrílico, el tolueno y el naftaleno (Ullrich y Hofrichter, 2005). En función de las condiciones de reacción y de la estructura del sustrato, son capaces de catalizar diferentes reacciones químicas: N-oxidación, oxigenación aromática, hidroxilación y epoxidación (Makela et al., 2015). Las APO combinan las características catalíticas de las citocromo P450 monooxigenasas y las peroxidasas lo que les confiere un enorme potencial

biotecnológico (Hofrichter et al., 2010; Knop et al., 2015). La implicación de las peroxigenasas en la degradación de compuestos modelo de lignina ha sido demostrada recientemente (Makela et al., 2015).

Además del  $Mn^{2+}$ , mediador necesario de la MnP y que también puede utilizar la VP, existen varios metabolitos fúngicos y productos de degradación de la lignina que actúan como mediadores de la LiP y la VP. Como ejemplo de éstos cabe mencionar el alcohol veratrílico, cuya producción por *Phanerochaete chrysosporium* llega a alcanzar hasta un 10 % del peso del hongo (Shimada et al., 1989). El radical catiónico de este compuesto producido por las peroxidases puede oxidar la mayoría de las unidades de la lignina (Zapanta y Tien, 1997).

El  $H_2O_2$  necesario para la acción de las peroxidases es producido por oxidasas como la aril alcohol oxidasa (AAO) descrita en *P. eryngii* (Guillén et al., 1992). Además de la lacasa, peroxidases y oxidasas, en la degradación de lignina participan deshidrogenasas asociadas al micelio de los hongos, como la aril-alcohol deshidrogenasa (AAD) y la quinona reductasa (QR) (Guillén et al., 1997; Gutiérrez et al., 1994). La acción cooperativa de todas estas enzimas conduce al establecimiento de ciclos redox en los que se produce  $H_2O_2$  (Gómez-Toribio et al., 2009b; Guillén et al., 2000a; Guillén et al., 2000b). Si la generación de  $H_2O_2$  se realiza en presencia de Fe, se establece la reacción de Fenton con la consecuente producción de  $\cdot OH$  (Gómez-Toribio et al., 2009b). Este mecanismo de producción de  $\cdot OH$ , así como otros utilizados por los hongos de podredumbre blanca se describen en detalle a continuación (apartado 1.3.4 de esta introducción).

#### **1.3.4. Generación de agentes ligninolíticos de bajo peso molecular**

Diversos estudios realizados durante la degradación de materiales lignocelulósicos por los hongos de podredumbre blanca han revelado que las enzimas implicadas en la degradación de los polímeros mayoritarios que los constituyen son demasiado grandes para penetrar a través de los poros de la pared celular vegetal, sobre todo en las primeras fases del proceso, y que la lignina se degrada sin que haya tenido lugar una interacción directa con las enzimas ligninolíticas (Daniel et al., 1989; Daniel et al., 1990; Daniel et al., 1991; Flournoy et al., 1993; Goodell et al., 1998; Srebotnik et al., 1988). Estos estudios ponían de manifiesto que, al menos durante las primeras fases del proceso degradativo, los agentes ligninolíticos implicados son mucho más pequeños que las enzimas. Estos agentes, tal como se ha indicado anteriormente, pueden ser iones oxidados de metales, como el  $Mn^{3+}$ , radicales de metabolitos fúngicos y/o productos de despolimerización de lignina y RLO, como los  $\cdot OH$ .

La producción de  $\cdot OH$  por hongos de podredumbre blanca se realiza mediante la reacción de Fenton de forma similar a como ocurre en los hongos de podredumbre parda (apartado 1.3.2 de la Introducción). La mayor parte de los estudios de producción de dichos radicales por estos hongos han sido realizados *in vitro*, concretamente en reacciones enzimáticas y de metabolitos fúngicos. Hasta la fecha se han descrito varios mecanismos que podrían sustentar la producción extracelular de  $\cdot OH$ , entre los que cabe citar uno químico y dos enzimáticos. El primero implica a un glicopéptido, detectado en cultivos de *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Irpex lacteus*, que presenta la capacidad de unirse al  $Fe^{3+}$  y reducirlo a  $Fe^{2+}$ , siendo el complejo resultante capaz de catalizar la reducción del  $O_2$  a  $H_2O_2$  en presencia de ciertos dadores electrónicos (Tanaka et al., 1999a; Tanaka et al., 1999b). Entre los mecanismos enzimáticos se encuentra un mecanismo directo, catalizado por la celobiosa deshidrogenasa (CDH), y diferentes mecanismos indirectos, en los que participan las enzimas ligninolíticas.

La CDH es la única enzima implicada en la degradación de la lignocelulosa capaz de reducir directamente el  $O_2$  a  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  y el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . En otras palabras, cataliza la producción del reactivo de Fenton (Kremer y Wood, 1992). Tras el estudio del ciclo catalítico de la CDH, (2003) propusieron un mecanismo de producción de  $\cdot OH$  catalizado por la enzima. En dicho mecanismo,

los grupos FAD y hemo estarían implicados en la reducción del  $O_2$  y el grupo hemo, a su vez, en la reducción de complejos del  $Fe^{3+}$ .

Los mecanismos de producción de  $\cdot OH$  en los que participan las enzimas ligninolíticas (Barr et al., 1992; Guillén et al., 1992), se conocen desde hace tiempo. Hasta la fecha se han descrito dos mecanismos de producción de  $\cdot OH$  mediados por las enzimas ligninolíticas. El primero se demostró con la lignina peroxidasa (LiP) del hongo *P. chrysosporium* y requiere la oxidación en cadena de dos metabolitos fúngicos para la formación del radical que reduce el  $O_2$  a  $O_2^{\cdot -}$ , además de una fuente adicional del  $H_2O_2$  necesario para la actuación de la enzima (Barr et al., 1992). En este mecanismo los radicales  $\cdot OH$  se producen a través de una reacción de Fenton dirigida por  $O_2^{\cdot -}$  (reacción de Haber-Weiss) ya que es éste el que reduce el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ .

El segundo mecanismo fue descrito por (Guillén et al., 2000b). Estos autores, centrados en el estudio de los mecanismos que utilizan los hongos ligninolíticos para activar el oxígeno, mostraron las primeras evidencias de la implicación de la lacasa en la producción de  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$  mediante la oxidación de hidroquinonas en presencia de iones metálicos (Guillén et al., 2000a; Guillén et al., 2000b), así como que la presencia de deshidrogenasas intracelulares de los hongos, conduce al establecimiento de ciclos redox de producción de especies reducidas de oxígeno en el medio extracelular (Guillén et al., 1994; Guillén et al., 1997; Guillén y Evans, 1994). Dicho mecanismo se muestra en la figura 3 y responde a la siguiente secuencia de reacciones:

- 1) Reducción de la quinona (Q) a hidroquinona ( $QH_2$ ) por la quinona reductasa intracelular (QR).
- 2) Oxidación de la  $QH_2$  a semiquinona ( $Q^{\cdot -}$ ) por la lacasa.
- 3) Conversión de la  $Q^{\cdot -}$  en Q vía autooxidación, con la consiguiente reducción del  $O_2$  a radical superóxido.
- 4) Reducción del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  principalmente por la  $Q^{\cdot -}$  [4a] y, en menor grado por el  $O_2^{\cdot -}$  [4b].
- 5) Producción de  $H_2O_2$  vía dismutación del  $O_2^{\cdot -}$ .
- 6) Producción de  $\cdot OH$  por la reacción de Fenton.

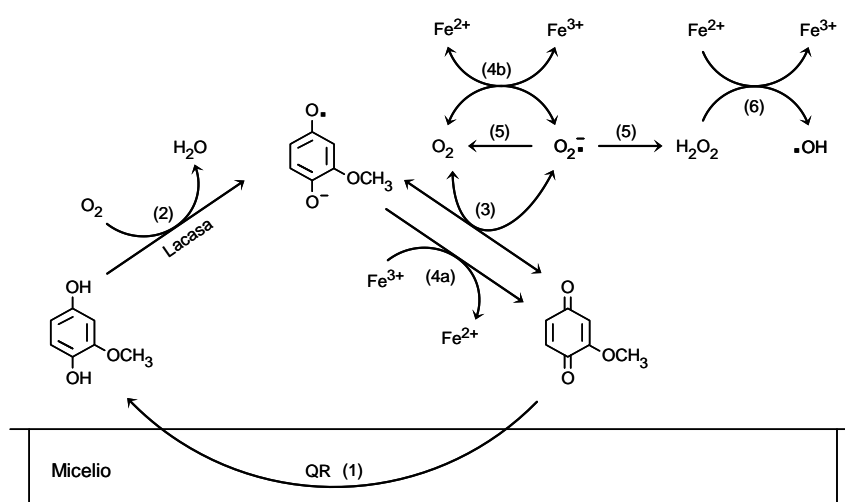


Figura 3. Mecanismo de producción extracelular de radical hidroxilo en *P. eryngii* mediante ciclos redox de quinonas en presencia de  $Fe^{3+}$  ilustrado con la 2-metoxi-1,4-benzoquinona



#### 1.4. PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN AVANZADA (PBOA)

El aprovechamiento de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  por los hongos de podredumbre blanca para la degradación de compuestos contaminantes se ha visto limitado por la carencia de un conocimiento preciso de los mecanismos que los producen y, posteriormente, por no saber cómo controlarlos. Aunque en la actualidad se conocen varios de estos mecanismos, los mayores avances en el campo de la degradación de compuestos contaminantes se han logrado con el descrito en estudios de la lacasa del hongo *Pleurotus eryngii* (Gómez-Toribio et al., 2009b; Guillén et al., 2000a). Utilizando esta estrategia para inducir la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en *P. eryngii*, se obtuvo la primera evidencia de oxidación avanzada de dos compuestos contaminantes (fenol y el colorante Reactive Black 5) por un microorganismo ligninolítico (Gómez-Toribio et al., 2009a). Posteriormente, se ha llevado a cabo la oxidación avanzada de un mayor número de colorantes, así como de compuestos tan recalcitrantes como los BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno e isómeros del Xileno) (García-Martín, 2017). La degradación de BTEX mediante la inducción de  $\cdot\text{OH}$  también ha sido llevada a cabo con *T. versicolor*, habiéndose demostrado asimismo la efectividad de dichos radicales en la degradación de hidrocarburos aromáticos y alifáticos clorados (Aranda et al., 2010; Marco-Urrea et al., 2009).

Este mecanismo de inducción de la producción de  $\cdot\text{OH}$  ha sido demostrado con las quinonas más representativas derivadas de las tres unidades que forman la lignina, 1,4-benzoquinona (BQ), 2-metoxi-1,4-benzoquinona (MBQ) y 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (2,6-DBQ) y, dado su carácter cíclico, conduce a la producción continua y lineal de radicales  $\cdot\text{OH}$ , durante varias horas. Esta posibilidad de producción continua de  $\cdot\text{OH}$  mediante el uso de hongos ligninolíticos y/o las enzimas que producen, junto con gran potencial para la degradación de contaminantes de forma similar a los POA ha llevado a acuñar el término “procesos de biooxidación avanzada (PBOA)”. En dichos procesos es posible además el control cuantitativo de la producción de  $\cdot\text{OH}$  en función de varios parámetros que inciden en la velocidad del ciclo y en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producidos, tales como la concentración de lacasa, el tipo de quinona y quelante del  $\text{Fe}^{3+}$  y la presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  (Gómez-Toribio et al., 2009a). Un esquema incluyendo alguno de estos agentes promotores se presenta en la figura 4.

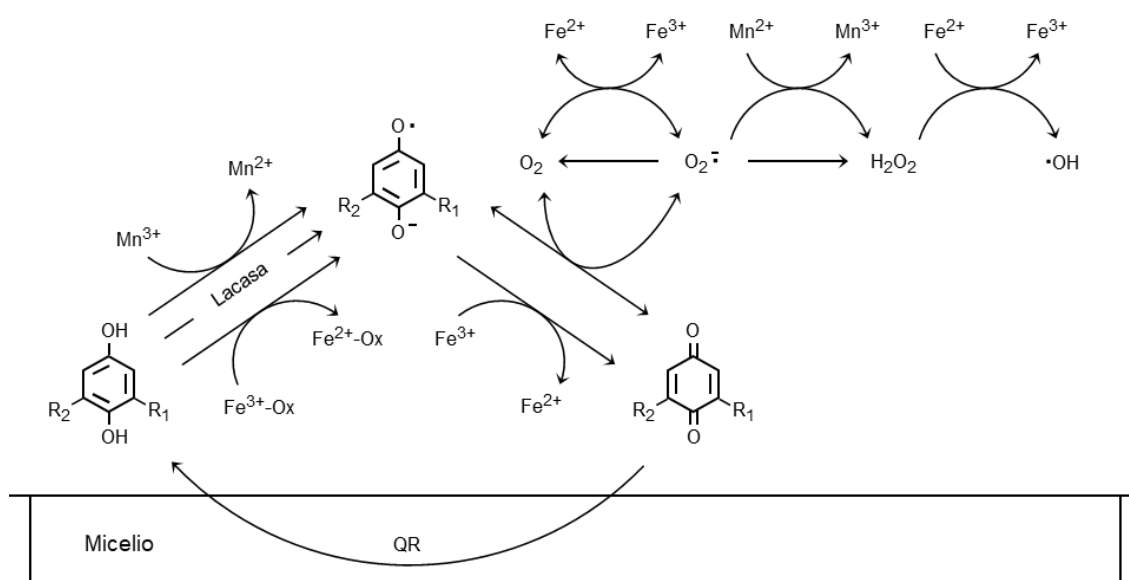


Figura 4. Mecanismo de producción extracelular de radical hidroxilo en *P. eryngii* mediante ciclos redox de quinonas en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato y  $\text{Mn}^{2+}$ , ilustrado con la 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona

La presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  incrementa la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puesto que puede reducir el  $\text{O}_2\cdot^-$  producido por autooxidación de la semiquinona (2,6-DBQ $\cdot^-$ ) a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generándose  $\text{Mn}^{3+}$  en el proceso. El  $\text{Mn}^{3+}$  por su parte puede oxidar a la DBQH $_2$  siendo los productos de esa reacción  $\text{Mn}^{2+}$

y 2,6-DBQ $\cdot^-$  por lo que el Mn actúa como catalizador de la oxidación de 2,6-DBQH $_2$  por O $_2\cdot^-$ . Por otro lado, como la autoxidación de la 2,6-DBQ $\cdot^-$  es reversible, la reducción del O $_2\cdot^-$  por el Mn $^{2+}$  desplaza dicha reacción hacia la producción de 2,6-DBQ, predominando la autoxidación sobre el resto de reacciones que puede sufrir la 2,6-DBQ $\cdot^-$ , aumentando el número de ciclos por unidad de tiempo. El efecto promotor del oxalato se debe a que forma un complejo con Fe $^{3+}$  capaz de oxidar a la 2,6-DBQH $_2$ , generándose a su vez Fe $^{2+}$  para el reactivo de Fenton y aumentando la velocidad del ciclo redox. Un efecto similar sobre la velocidad del ciclo se puede obtener al modificar la concentración de lacasa, puesto que esta enzima cataliza la oxidación de la 2,6-DBQH $_2$ . Sin embargo, un exceso en la concentración de dicha enzima puede resultar perjudicial para la producción de  $\cdot$ OH puesto que puede llegar a competir con el O $_2$  para oxidar a la 2,6-DBQ $\cdot^-$ , reduciendo la generación de O $_2\cdot^-$ .

Este sistema descrito en *P. eryngii* también ha sido comprobado en otros hongos ligninolíticos productores de lacasas y peroxidasas por sus propios autores (Gómez-Toribio et al., 2009a). y más concretamente en *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia radiata* y *Pycnoporus cinnabarinus*, detectándose producción de  $\cdot$ OH con todos ellos, si bien los niveles variaron entre los distintos hongos. También ha sido demostrada la posibilidad de inducir la producción de radicales  $\cdot$ OH en bacterias filamentosas productoras de lacasa del género *Streptomyces* (Blánquez, 2015; Moya, 2011), que también poseen una enzima intracelular, denominada lipoamida deshidrogenasa con actividad quinona reductasa (QR) (Youn et al., 1998; Youn y Kang, 2000). En estudios más recientes se ha demostrado la posibilidad de generar  $\cdot$ OH incluso en varios hongos ascomicetos carentes de enzimas ligninolíticas tras comprobar que poseían actividades QR (Krueger et al., 2016). En este sentido la diversidad de microorganismos capaces de producir radicales  $\cdot$ OH mediante ciclos redox de quinonas podría ser aún mayor debido a la ubicuidad de la actividad QR en distintos grupos microbianos. En hongos se han descrito deshidrogenasas intracelulares que emplean NAD(P)H como donador de electrones, habiendo sido detectadas en hongos de podredumbre blanca como *P. chrysosporium* (Brock et al., 1995) y *P. eryngii* (Gómez-Toribio et al., 2009a) y de podredumbre parda, como por ejemplo en *G. trabeum* (Cohen et al., 2004; Qi y Jellison, 2004). Como ya se ha comentado anteriormente lipoamidas deshidrogenasas se encuentran presentes en bacterias filamentosas del género *Streptomyces*. En otros procariontes como *Escherichia coli* existe una FMN-quinona oxidoreductasa dependiente de NAD(P)H en el citoplasma, denominada Wrba (Patridge y Ferry, 2006) así como otras enzimas con actividad sobre quinonas como las nitrorreductasas NfsA y NfsB (Rau y Stolz, 2003), y la azorreductasa AZR (Liu et al., 2009). Además, es posible que enzimas pertenecientes a la cadena respiratoria como la ubiquinona oxidoreductasa dependiente de NADH presente en su membrana (Uden y Bongaerts, 1997) pudiesen actuar sobre quinonas presentes en el medio.

## 1.5. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La creciente concienciación sobre los problemas de contaminación de las aguas y sus efectos sobre los ecosistemas y la salud humana ha llevado al desarrollo de una legislación cada vez más exigente en cuanto a su prevención y tratamiento. Con objeto de cumplir con los nuevos requisitos fijados se hace necesario el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías de tratamiento de aguas contaminadas con compuestos para los cuales los tratamientos convencionales no resultan efectivos. En este sentido cabe destacar los POA antes mencionados y la aplicación de hongos ligninolíticos y sus enzimas. En ambos casos su idoneidad se debe a la baja selectividad y alta reactividad de los agentes implicados en la degradación, lo que amplía notablemente el espectro de compuestos susceptibles de ser eliminados. En el caso de los POA se genera un oxidante fuerte, generalmente  $\cdot$ OH, destacando los POA basados en el reactivo de Fenton. Los hongos ligninolíticos son aquellos capaces de degradar la madera y se han clasificado tradicionalmente en dos grupos, hongos de podredumbre blanca y parda. Los hongos de podredumbre blanca poseen enzimas ligninolíticas como lacasas y peroxidasas que actúan sobre

la lignina, en conjunto con compuestos de bajo peso molecular que incluyen iones como el  $Mn^{3+}$  o radicales derivados de la propia degradación de la lignina. Además durante el proceso se generan especies reactivas de oxígeno entre ellas  $\cdot OH$ . Los estudios en hongos podredumbre parda por otra parte se han centrado en los mecanismos de producción de radicales  $\cdot OH$  puesto que no poseen enzimas ligninolíticas, si bien no existe demasiada información con respecto a algunos de los compuestos de bajo peso molecular como el  $Mn^{3+}$  a los cuales si se les ha asignado un papel en la degradación de lignina en hongos de podredumbre blanca.

La posibilidad de inducir la producción de  $\cdot OH$  mediante ciclos redox de quinonas en hongos ligninolíticos (García-Martín, 2017; Gómez-Toribio et al., 2009a; Gómez-Toribio et al., 2009b), de forma continua, pudiendo incluso modularse los niveles de dicha producción, lo que incrementa su capacidad degradativa, ha abierto una nueva línea de investigación prometedora basada en el potencial degradativo de los  $\cdot OH$ , que hasta ahora han demostrado su eficacia en la degradación de colorantes textiles y BTEX entre otros contaminantes. Además, la amplia distribución en el mundo microbiano de enzimas con actividad QR, esencial para dicho sistema, hace pensar que sea posible su aplicación en nuevos grupos de microorganismos. Una mayor amplitud de microorganismos capaces de producir radicales  $\cdot OH$  mediante este sistema permitiría seleccionar aquellos que se adecuen mejor a las condiciones de las aguas a tratar, incrementando la eficacia del proceso de tratamiento.

En este contexto, se propusieron los siguientes objetivos para esta tesis:

1. Determinar bajo diferentes condiciones experimentales los componentes clave para que se establezcan ciclos redox de quinonas en hongos de podredumbre blanca, que conduzcan a la producción extracelular de  $\cdot OH$ .
2. Evaluar el efecto del  $Mn^{2+}$  en la producción de especies reactivas de oxígeno a través de ciclos redox de quinonas en hongos de podredumbre parda.
3. Explorar la posibilidad de inducir la generación extracelular de  $\cdot OH$  vía ciclos redox de quinonas en hongos ascomicetos y bacterias no filamentosas, determinando los componentes clave del proceso y mecanismos de control.
4. Analizar el efecto de inducir la producción de  $\cdot OH$  en la capacidad degradativa de *Coriopsis rigida*.
5. Diseñar procesos de biooxidación avanzada de compuestos contaminantes con microorganismos seleccionados por su eficacia para la producción de  $\cdot OH$
6. Determinar el efecto de la inducción de  $\cdot OH$  sobre la viabilidad de los microorganismos.
7. Estudiar la posibilidad de reutilizar los microorganismos en tandas sucesivas de biooxidación avanzada.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2.1. COMPUESTOS Y ENZIMAS UTILIZADOS

La siguiente tabla muestra los compuestos empleados en la realización de esta tesis doctoral así como su procedencia.

Acid Black 24	Aldrich
Acid Black 48	Sigma-Aldrich
Acid Blue 45	Aldrich
Acid Blue 113	Aldrich
Acid Green 25	Aldrich
Acid Orange 63	Sigma-Aldrich
Acid Red 88	Sigma-Aldrich
Acid Yellow 17	Sigma-Aldrich
Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	Sigma-Aldrich
Ácido clofíbrico	Aldrich
Ácido 3,4-dimetoxifenilacético (homoverátrico)	Aldrich
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma
Ácido 4-hidroxibenzoico	Aldrich
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (siringico)	Sigma
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (vaníllico)	Sigma
Ácido oxálico	Sigma
Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)	Sigma
Ácido tricloroacético (TCA)	Scharlau
Alcohol 3,4 dimetoxibencílico (veratrílico)	Aldrich
Alcohol 4-hidroxibencílico	Sigma
Alcohol 4-hidroxi-3,5-dimetoxibencílico (siringílico)	Alfa Aesar
Alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (vaníllico)	Aldrich
Azure B	Aldrich
1,4-Benzohidroquinona (BQH <sub>2</sub> )	Aldrich
1,4-Benzoquinona (BQ)	Aldrich
Bisfenol A	Aldrich
Brilliant Green	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich
Carbamazepina (CBZ)	Sigma
Chromotrope 2R	Aldrich
Ciprofloxacino	Aldrich
Cloruro férrico	Aldrich
Cresol Red	Sigma-Aldrich
Crocein Orange G	Sigma-Aldrich
Crystal Violet	Sigma-Aldrich
2-Desoxiribosa	Sigma
Diclofenaco	Sigma
2,5-Dimetoxi-1,4-benzoquinona	TCI
2,6-Dimetoxi-1,4-benzoquinona	Aldrich
3,4-Dimetoxibenzaldehído (veratraldehído)	Aldrich
2,6-Dimetoxifenol	Aldrich
Extracto de levadura	BD
4-Hidroxibenzaldehído	Sigma-Aldrich
4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído)	Aldrich
4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vanillina)	Aldrich
Indigo Carmine	Sigma-Aldrich
Iron(III)phthalocyanine	Sigma-Aldrich

Methyl Blue	Sigma
Methyl Orange	Sigma-Aldrich
Naproxeno	Aldrich
Neutral Red	Sigma-Aldrich
New Coccine	Sigma-Aldrich
Norfloxacino	Aldrich
Orange II	Sigma
Orange G	Sigma-Aldrich
Paracetamol	Aldrich
Peptona	BD
Peroxidasa de rábano (HRP, EC 1.11.1.7)	Sigma
Peróxido de hidrógeno (Perhidrol 30%)	Merck
Ponceau SS	Aldrich
Reactive Black 25	Sigma-Aldrich
Reactive Blue 19	Sigma-Aldrich
Rojo fenol	Merck
Sulfato de cobre	Panreac
Sulfato de manganeso (II)	Panreac
Tartrazine	Sigma
Tolueno	Aldrich
Tropaeolin O	Sigma
Tween 20	Panreac
Tween 80	Sigma

La 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona y la 2,5-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona se obtuvieron por reducción de las quinonas correspondientes con borohidruro de sodio, siguiendo los procedimientos descritos por Baker (1941) y Newcombe et al. (2002), respectivamente. El resto de los compuestos usados fue de grado analítico y el agua utilizada fue desionizada mediante el sistema MilliQ de Millipore.

## 2.2. ORIGEN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos empleados en el desarrollo de esta tesis fueron:

*Corioloopsis rígida*. Aislado de un bosque subtropical lluvioso de Argentina (Ibañez, 1998). Se encuentra depositada en la Colección de Cultivos del Instituto Spegazzini (CLPS 232) de la Plata (Argentina) y en la colección del centro de investigaciones biológicas (IJFM A765).

*Trametes versicolor*. La cepa utilizada en este trabajo se encuentra depositada en la "American Type Culture Collection" (ATCC) con el número de acceso 42530.

*Gloeophillum trabeum*. Depositado en la colección del USDA Forest Products Laboratory (Madison, Wisconsin) con el número de acceso Mad 617-R

*Aspergillus nidulans*. Se empleó una cepa auxótrofa para D-biotina cedida por el Dr. M. A. Peñalva del Centro de investigaciones Biológicas, CSIC).

*Penicillium oxalicum*. Cedido por la Dra Elisabet Aranda de la Universidad de Granada.

*Pseudomonas putida* KT2440 y *Escherichia coli* K-12 MG1655 fueron cedidas por la Dra Laura Isabel de Eugenio Martínez.

### 2.3. CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

#### 2.3.1. Medios de cultivo

Medio agar patata dextrosa (PDA). Para su preparación se disolvieron 39 g de PDA (BD Difco) en 1 l de agua destilada. Este medio fue empleado para la conservación de los hongos.

Medio de recuento en placa (PCA). Este medio contiene por litro 5 g de triptona, 2,5 g de levadura, 1 g de dextrosa y 20 g de agar y fue empleado para los recuentos de viables de *E. coli*.

Medio malta. Fue preparado con extracto de malta al 2% y esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos para el cultivo de *T. versicolor*. Para el cultivo en placa de los hongos se añadió agar al 2% a este medio.

Medio Czapek-Dox, suplementado con extracto de levadura y peptona. Empleado para el cultivo de *C. rigida*. Un litro de este medio contiene 10 g de glucosa, 2 g de tartrato amónico, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de KCl, 1 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 1 ml de solución mineral, cuya composición por litro es: 100 mg de  $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 70 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 10 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . La esterilización en autoclave se llevó a cabo a 110 °C durante 30 minutos. Este medio fue empleado también en las incubaciones de *P. oxalicum* reduciendo la cantidad de glucosa a 5 g/l.

Medio YMPG. La composición por litro de este medio es de 10 g de glucosa, 10 g de extracto de malta, 2 g de peptona, 2 g de extracto de levadura 1 g de asparagina, 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . La esterilización en autoclave se realizó a 110 °C durante 30 min. Finalmente se añadieron 10 ml/l de una solución de tiamina con concentración de 100 mg/l que fue esterilizada por filtración para realizar los cultivos de *G. trabeum*.

Medio de Kirk. Dos versiones de este medio con diferente concentración de nitrógeno, medio de Kirk HC/HN y medio de Kirk HC/LN, fueron empleadas en para el cultivo de *G. trabeum*. El medio de Kirk HC/HN fue preparado en tampón 2,2-dimetilsuccinato 10 mM pH 5 y contiene por litro 10 g de glucosa, 0,92 g de tartrato amónico (5 mM), 0,66 g de asparagina (5 mM), 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CaCl}_2$ , y 10 ml de la solución de elementos traza, cuya composición por litro es de 3 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de NaCl, 0,1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CoCl}_2$ , 0,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,01  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,01  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 1,5 g de ácido nitrilotriacético. Tras su esterilización en autoclave a 110 °C durante 30 minutos se añadieron 10 ml/l de una solución de tiamina con concentración de 100 mg/l que fue esterilizada por filtración.

El medio de Kirk HC/LN, presenta la misma composición únicamente del anterior, variando únicamente la concentración de tartrato amónico y asparagina que en esta ocasión fue de 0,5 mM.

Medio definido de Aspergillus nidulans. Su composición por litro es la siguiente: 10g de glucosa, 0,92 g de tartrato amónico, 0,52 g de KCl, 0,52 g de  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,52 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1ml de una solución de elementos traza que contiene por litro: 40 mg de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ , 400 mg de  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 800mg de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times \text{H}_2\text{O}$ , 864 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 8 mg de  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ . El pH del medio fue ajustado a 6,8 con una solución saturada de NaOH y se esterilizó en autoclave a 110 °C durante 30 minutos. Finalmente se añadió por litro 10 ml de una solución de concentración 10 mg/l de D-Biotina, que fue esterilizada por filtración, como requerimiento específico de la cepa auxótrofa.



Medio Luria-Bertani (LB). Este medio fue empleado para el cultivo de las bacterias *P. putida* y *E. coli*. Su composición por litro es 10 g de triptona, 5g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Para la preparación de medio LB sólido se añadió agar al 2%.

### **2.3.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos**

Los hongos de empleados en la realización de esta tesis fueron conservados a 4º C en tubos inclinados de PDA cubiertos con vaselina líquida, salvo en el caso de *A. nidulans* y *P. oxalicum*, para los cuales se prepararon suspensiones de esporas en glicerol al 20% y Tween 20 al 0,2% que se mantuvieron a -20ºC. Para la obtención de la suspensión de esporas se realizaron cultivos de *A. nidulans* y *P. oxalicum* en placas Petri con agar-malta a 37 y 28 ºC respectivamente. Tras su esporulación se añadieron a cada placa 10 ml de Tween 20 al 2% y glicerol al 20% estériles y se raspó la superficie de la placa suavemente, para finalmente recoger la suspensión obtenida y alicuotarla en eppendorfs.

En el caso de las bacterias una suspensión de células de estas fue conservada a -20ºC en glicerol al 20%. Dicha suspensión de células fue preparada a partir de a cultivos de *P. putida* y *E. coli* llevados a cabo en placas Petri con medio LB, durante 24 h a 28 y 37 ºC respectivamente, añadiendo 10 ml de glicerol al 20% para a continuación raspar la superficie de la placa y recoger la suspensión obtenida en eppendorfs.

Para el mantenimiento de los microorganismos se llevaron a cabo resiembras periódicas, en placas con agar-malta en el caso de los hongos y en placas con LB en el caso de las bacterias.

### **2.3.3. Preparación de inóculos y condiciones de cultivo**

#### **2.3.3.1. Preparación de inóculos**

Como inóculo de *C. rigida*, *T. versicolor* y *G. trabeum* se utilizó micelio triturado de los hongos crecidos en el mismo medio y condiciones empleados para su cultivo, a partir de fragmentos de micelio extraídos de placas de agar malta. En todos los casos los cultivos se trituraron de forma aséptica usando una batidora "Osterizer pulse matic 16" durante 30 segundos a su mínima velocidad.

Como inóculos de *P. oxalicum* y *A. nidulans* se empleó la suspensión de esporas preparada tal y como se describe en el apartado 2.3.2.

En el caso de las bacterias, *E. coli* y *P. putida* se empleó como inóculo un cultivo en caldo LB de 12 y 8 h respectivamente obtenido a partir de 2 o 3 colonias crecidas en placas Petri con agar LB.

#### **2.3.3.2. Condiciones de cultivo**

El cultivo de *C. rigida* se llevó a cabo en medio Czapeck Dox suplementado con extracto de levadura y peptona con un inóculo de 0,15 mg de micelio de 6 días triturado por ml de medio, en oscuridad a 28 ºC y 180 rpm. Los experimentos llevados a cabo con este hongo se realizaron empleando micelio de 6 días crecido en las condiciones previamente indicadas salvo que se indique lo contrario.

*T. versicolor* fue cultivado en caldo de malta a partir de un inóculo de 0,3 mg de micelio de 5 días triturado por ml de medio. Los cultivos fueron llevados a cabo en oscuridad a 28ºC y 180 rpm. Micelio de 5 días, así cultivado, fue empleado en los experimentos que se realizaron con este microorganismo

Para el cultivo de *G. trabeum* se emplearon 3 medios, YMPG, Kirk HC/HN y Kirk HC/LN, en los que el hongo fue crecido de forma sucesiva. Para ello se empleó como inóculo de 0,5 mg de micelio de 7 días triturado por ml de medio a inocular. De forma previa a triturar el micelio a emplear como inóculo, a fin de evitar transferir restos de un medio al siguiente, el micelio se separó del medio por filtración y fue lavado con 200 ml de agua destilada esteril, dos veces, manteniendo condiciones asépticas durante todo el proceso. Los cultivos se realizaron en oscuridad a 28°C y 180 rpm.

*A. nidulans* fue cultivado en el medio definido de *A. nidulans* empleando como inóculo 150 µl de la suspensión de esporas por cada 100 ml de medio de cultivo. El cultivo fue llevado a cabo en oscuridad a 37°C y 180 rpm. Salvo que se indique lo contrario, el cultivo se realizó durante 3 días antes de emplear el micelio en los experimentos que incluyen a este microorganismo.

El cultivo de *P. oxalicum* se realizó en el medio Czapeck Dox suplementado con peptona y levadura, reduciendo la cantidad de glucosa que dicho medio presenta a 5 g/l. Como inóculo se emplearon 20 µl de la suspensión de esporas por cada 100 ml de medio y los cultivos se mantuvieron en oscuridad, a 28 °C y 120 rpm. El micelio empleado en los experimentos realizados con este hongo fue generalmente cultivado en las condiciones previamente descritas durante 2 días.

*P. putida* fue cultivada en caldo LB, a 28 °C y 180 rpm a partir de un inóculo de 10 µl de un cultivo en el mismo medio por ml.

El cultivo de *E. coli* se llevó a cabo en caldo LB, con un inóculo de 10 µl por ml de medio, en oscuridad a 37 °C y 180rpm.

#### **2.4. INCUBACIONES DE LOS MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE RADICALES ·OH**

Las condiciones estándar para inducir en los microorganismos la producción extracelular de ·OH a través de ciclos redox de quinonas fueron las siguientes: cantidades apropiadas de células lavadas se incubaron en tampón fosfato 20 mM con una quinona 500 µM, Fe<sup>3+</sup> 100 µM quelado con EDTA 110 µM u oxalato 300 µM, y 2-desoxirribosa 2,8 mM (empleada como sonda para la detección de ·OH; apartado 2.6.11) en matraces de 100 ml de capacidad con 33ml de mezcla de incubación. El micelio de los hongos se separó del cultivo por filtración, y las bacterias por centrifugación. Posteriormente se lavaron 2 veces con 200 ml de agua destilada. Las condiciones de temperatura y agitación durante la incubación fueron, salvo excepciones, las mismas que las empleadas para el cultivo de los microorganismos. Las muestras tomadas se ajustaron a un valor de pH de 2 con ácido fosfórico 7,4M. Variaciones de estas condiciones de incubación estándar se detallan para cada uno de los experimentos en el apartado de resultados.

#### **2.5. BIOOXIDACIÓN AVANZADA DE COLORANTES, FÁRMACOS Y DISRUPTORES ENDOCRINOS**

Los experimentos de biooxidación avanzada de compuestos contaminantes se llevaron a cabo en las condiciones estándar de producción de radicales ·OH (apartado 2.4) sustituyendo la 2-desoxirribosa por la cantidad apropiada de dichos compuestos.

#### **2.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

##### **2.6.1. Medida de la cantidad de micelio**

Para conocer la cantidad de micelio producido en los cultivos y usado en los experimentos de inducción de radicales hidroxilo y decoloración, se determinó el peso seco del mismo. En primer lugar el micelio se separó del líquido de cultivo mediante filtración. Posteriormente se lavó dos veces con 200 ml de agua destilada y se secó a 60 °C en una estufa con aireación hasta peso constante (generalmente durante una noche).

### **2.6.2. Estimación del crecimiento de bacterias**

El número de células viables presente en los cultivos se determinó utilizando el procedimiento de diluciones decimales sucesivas y siembra en placa. Las diluciones, hasta  $10^{-9}$ , se llevaron a cabo en una disolución de NaCl al 0,9%. A continuación, se depositaron tres gotas de 10  $\mu$ l de cada una de ellas en placas de PCA, convenientemente separadas. Tras el cultivo de las placas se realizó recuento de unidades formadoras de colonias (ufc). Para realizar el cálculo de ufc presentes en los cultivos se utilizó la expresión  $N = C \cdot D^{-1} \cdot i^{-1}$ , donde N= ufc/ml; C= colonias; D = dilución; i= volumen de inóculo.

El crecimiento también se estimó por la turbidez de los cultivos, midiendo la absorbancia de las muestras a 600 nm.

### **2.6.3. pH y soluciones tampón**

El pH se midió utilizando un pH-metro Thermo Orion modelo 720 provisto de un electrodo Thermo Orion modelo 8103SC. Todos los tampones se prepararon con soluciones de los ácidos correspondientes a la molaridad deseada. El pH se ajustó con la cantidad necesaria de una solución saturada NaOH.

### **2.6.4. Sustancias reductoras**

La concentración de glucosa presente en los cultivos del hongo se estimó como sustancias reductoras por el método Somogyi y Nelson (Somogyi, 1945), que se basa en la oxidación de azúcares por compuestos cúpricos en solución alcalina. Se utilizaron tres reactivos:

Somogyi I: en un volumen final de 800 ml se disolvieron 144 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 12 g de tartrato sódico potásico, 24 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 16 g de  $\text{NaHCO}_3$ .

Somogyi II: en un volumen final de 200 ml se disolvieron 36 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 4 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

El reactivo final de Somogyi se preparó justo antes de comenzar el análisis, mezclando las soluciones I y II en proporción 4:1.

Nelson: se disolvieron 50 g de molibdato amónico en 90 ml de agua; a continuación se añadieron 42 ml de ácido sulfúrico concentrado y se mezclaron con 6 g de arseniato sódico disueltos en 50 ml de agua. La solución resultante se mantiene durante 24-48 horas a 37 °C y se conserva en frasco de color topacio.

El procedimiento fue el siguiente: 0,2 ml de muestra (diluida o no en función de la concentración de glucosa) se mezclaron con 0,2 ml del reactivo de Somogyi, se incubó en agua hirviendo durante 15 minutos y se dejó enfriar. Después se añadieron 0,2 ml del reactivo de Nelson (0,2 ml), se agitó la mezcla y, finalmente, se añadieron 2,4 ml de agua. A continuación se leyó la absorbancia a 540 nm y, tras restar el blanco del reactivo, los valores obtenidos se convirtieron en concentración de sustancias reductoras haciendo referencia a una curva patrón de glucosa (lineal hasta 2 mM). La recta de regresión obtenida fue:

$$A_{540} = 0,6832 c \quad (R^2 = 0,99, c = \text{mM})$$

### **2.6.5. Peróxido de hidrógeno**

Para calcular la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de una muestra se empleó un método basado en la oxidación de rojo fenol por HRP (Pick y Keisari, 1980). El rojo fenol oxidado presenta a pH básico la máxima diferencia de absorción a 610 nm respecto a su forma reducida. La reacción se realizó en tampón

fosfato 100 mM, pH 6, con rojo fenol al 0,01%, 2,5 U de HRP por ml de reacción y el líquido problema. Transcurridos 5 minutos a temperatura ambiente se añadió la cantidad de NaOH necesaria para llevar la mezcla de reacción a pH 12,5 (50  $\mu$ l de NaOH 4 M por ml de reacción). El blanco de la reacción se realizó añadiendo NaOH a la mezcla de reacción antes que la peroxidasa. El valor de absorbancia a 610 nm se transformó en concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando una curva patrón (lineal hasta 20  $\mu$ M). La ecuación de la recta de regresión obtenida fue:

$$A_{610\text{ nm}} = 0,015 c - 0,0005 \quad (r = 0,99; c = \mu\text{M})$$

Para la realización de la curva patrón, puesto que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se descompone gradualmente, se calculó su concentración en la solución comercial a partir del valor de absorbancia a 230 nm de una dilución apropiada ( $\epsilon_{230} = 81 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 2.6.6. Ión Ferroso

La estimación de la reducción de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> se realizó empleando 1,10-fenantrolina, quelante específico de la forma reducida del metal con un máximo de absorción a 510 nm (Barr et al., 1992). La concentración de 1,10-fenantrolina empleada en los experimentos fue de 1,5 mM. Los valores de absorbancia a 510 nm obtenidos de las muestras fueron transformados a concentración de Fe<sup>2+</sup> mediante una curva patrón expresada en la siguiente ecuación:

$$A_{510\text{ nm}} = 0,0106 c \quad (r = 0,99; c = \mu\text{M})$$

### 2.6.7. Quinonas e hidroquinonas

La concentración de las quinonas e hidroquinonas empleadas en esta tesis en incubaciones con los microorganismos en las que únicamente se incluían estos compuestos se calculó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), empleando el cromatógrafo de Agilent Technologies modelo 1260 infinity, equipado con un detector de diodos, y la columna de fase reversa funcionalizada ACE 3 C18-PFP, 50 x 2,1 mm. Para ello se tomaron muestras, cuyo pH fue ajustado a 2 con una solución de ácido fosfórico 7,4 M al ser tomadas. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes: flujo de 0,5 ml min<sup>-1</sup>, temperatura de 30°C y fase móvil compuesta por un 5% de metanol y un 95% de ácido fórmico al 1%. A continuación se muestran las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas al representar las áreas de los picos obtenidos con diferentes concentraciones de los compuestos estándar, y que fueron utilizadas para calcular la concentración de hidroquinonas y quinonas presente en las muestras.

$$2,6\text{-DBQ} \quad A_{280} = 1,3768 c \quad (R^2 = 0,99; c = \mu\text{M})$$

$$2,6\text{-DBQH}_2 \quad A_{280} = 0,3141 c \quad (R^2 = 0,99; c = \mu\text{M})$$

$$2,5\text{-DBQ} \quad A_{280} = 2,7865 c \quad (R^2 = 0,99; c = \mu\text{M})$$

$$2,5\text{-DBQH}_2 \quad A_{280} = 0,3922 c \quad (R^2 = 0,99; c = \mu\text{M})$$

En las incubaciones con fármacos, disruptores endocrinos, colorantes u otros compuestos en la valoración de las quinonas presentes se realizó en las mismas condiciones descritas para dichos compuestos en los apartados correspondientes, realizando las curvas patrón adecuadas a partir los compuestos comerciales.

### 2.6.8. Colorantes

La oxidación de los colorantes objeto de estudio se evaluó mediante espectrofotometría, a las longitudes de onda de máxima absorbancia del espectro visible de cada uno de ellos. Para determinar los máximos de absorción de los colorantes se realizaron espectros de los mismos

entre 200 y 800 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001, tras ajustar su pH a 2. De esos máximos se seleccionaron aquellos del espectro visible. Las longitudes de onda se muestran en la tabla 3.6.

Los experimentos en los cuales se realizaron estudios de degradación de los colorantes, monitorizando su concentración, se realizaron empleando un cromatógrafo de Agilent Technologies modelo 1260 infinity, en las condiciones que se indican a continuación para cada uno de los colorantes

Acid Yellow 17, Chromotrope 2R, Crocein Orange G, Orange II y Tropaeolin O fueron eluidos a 1,0 mL min<sup>-1</sup> y temperatura ambiente utilizando una columna de fase reversa Nucleosil C18 (25 cm x 0,46 cm i.d. Sharlau) y un gradiente lineal de agua:ACN desde 0 a 100 % en 10 minutos.

Methyl Orange y Tartrazine fueron eluidos a 1,0 ml/min y a una temperatura de compartimento de columna de 40 °C utilizando una columna de fase reversa (Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm, 3,0 x 50 mm) en modo isocrático. Las fases de elución utilizadas fueron ácido acético 10 mM (fase A) y ACN (fase B). El porcentaje de fase B utilizado para cada uno de ellos fue de 25 y 10 %, respectivamente.

New Coccine fue eluido a 1,0 ml/min y a una temperatura de compartimento de columna de 30 °C utilizando una columna de fase reversa (Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm, 3,0 x 50 mm) con agua mQ (fase A) y ACN (fase B) como fases de elución. El gradiente empleado se encuentra en la siguiente tabla

Tiempo (min)	ACN (%)
0	0
0,5	0
1	20
4	20
4,1	100
5	2
5	100
5,1	0
6	0

A continuación, se muestran las ecuaciones de las rectas de regresión que se obtuvieron con los compuestos estándar (el rango de concentraciones utilizado con cada compuesto estuvo comprendido entre 10 y 100 µM) y que fueron utilizadas para calcular la concentración de los distintos compuestos.

Acid Yellow 17	$A_{402} = 31.034 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Chromotrope 2R	$A_{505} = 27.866 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Crocein Orange G	$A_{480} = 17.363 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Orange II	$A_{485} = 19.588 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Tropaeolin O	$A_{388} = 20.853 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Methyl Orange	$A_{457} = 12,737 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Tartrazine	$A_{427} = 9,7989 c$ ( $r = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )

New Coccine

$$A_{506} = 10,345 c \quad (r = 0,99; c = \mu\text{M})$$

### 2.6.9. Concentración de fármacos y disruptores endocrinos

Para la determinación de la concentración de fármacos y disruptores endocrinos empleados en las incubaciones con los microorganismos se empleó un cromatógrafo de Agilent Technologies modelo 1260 infinity, equipado con un detector de diodos, y la columna de fase reversa funcionalizada ACE 3 C18-PFP, 50 x 2,1 mm. El pH de las muestras fue ajustado a 2 con una solución de ácido fosfórico 7,4 M al ser tomadas. 2  $\mu\text{l}$  de dichas muestras fueron inyectadas en la columna, con un flujo de 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$  y temperatura de 30°C. Las condiciones de elución de los compuestos se presentan a continuación, siendo la fase A ácido fórmico al 1% en todos los casos.

Paracetamol	
Tiempo (min)	Metanol (%)
0	5
6	15
8,5	100
12,5	100
12,6	5
17,5	5

Ciprofloxacino y Norfloxacino	
Tiempo (min)	Metanol (%)
0	5
6	15
9	40
12,5	70
13	100
15	100
15,1	5
20	5

Naproxeno y ácido clofíbrico	
Tiempo (min)	ACN (%)
0	10
2,01	10
4	30
13	30
15	10
17	10

Bisfenol A	
Tiempo (min)	Metanol (%)
0	5
6	15
7,5	60
12,5	60
12,6	5
18,5	5

Diclofenaco	
Tiempo (min)	Metanol (%)
0	5
6	15
7,5	60
14	60
14,1	100
16	100
16,1	5
21	5

CBZ	
Tiempo (min)	Metanol (%)
0	5
6	15
9	40
12,5	50
13	50
13,1	75
14	75
14,1	5
20	5

A continuación, se muestran las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas al representar las áreas de los picos obtenidos con diferentes concentraciones de los compuestos estándar, y

que fueron utilizadas para calcular la concentración de fármacos y disruptores endocrinos presentes en las muestras.

Paracetamol	$A_{280} = 0,5072 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Ciprofloxacino	$A_{280} = 4,3957 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Norfloxacino	$A_{280} = 4,7283 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Naproxeno	$A_{280} = 0,3411 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Ácido clofibrico	$A_{280} = 0,7250 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Diclofenaco	$A_{280} = 0,9987 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Bisfenol A	$A_{280} = 0,9907 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
CBZ	$A_{280} = 0,9991 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )

#### **2.6.10. Ácido homoverátrico, alcohol veratrílico, veratraldehído y mediadores de la lacasa**

La concentración de los compuestos mediadores en incubaciones con *C. rigida* o la lacasa purificada de dicho hongo, así como la comprobación de la ruptura del enlace  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  del ácido homoverátrico por el sistema lacasa-mediador como producción de alcohol veratrílico y veratraldehído, fue llevada a cabo empleando un cromatógrafo de Agilent Technologies modelo 1260 infinity, equipado con un detector de diodos, y la columna de fase reversa reversa Nucleosil  $C_{18}$  (25 cm x 0,46 cm i.d. Sharlau). Para ello, el pH de las muestras fue ajustado a 2 con una solución de ácido fosfórico 7,4 M al ser tomadas. La elución de los compuestos presentes en las muestras se realizó a un flujo de 1 ml/min y a una temperatura de compartimento de columna de 40 °C en modo isocrático empleando como fase móvil metanol al 40% y ácido acético 10mM al 60%. Las áreas de los picos correspondientes al ácido homoverátrico, alcohol veratrílico, veratraldehído y los distintos mediadores fueron convertidas a concentración empleando una curva patrón de los compuestos comerciales. Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas fueron las siguientes:

Ácido homoverátrico	$A_{280} = 1,6850 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Alcohol veratrílico	$A_{280} = 2,1797 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Veratraldehído	$A_{280} = 8,4069 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Acetosiringona	$A_{280} = 3,7577 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Ácido siríngico	$A_{280} = 5,5344 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Ácido 4-hidroxibenzoico	$A_{280} = 1,8319 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Alcohol 4-hidroxibencílico	$A_{280} = 0,7983 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )
Siringaldehído	$A_{280} = 2,0488 c$ ( $R^2 = 0,99$ ; $c = \mu\text{M}$ )

#### **2.6.11. Radical hidroxilo**

Se utilizaron dos procedimientos diferentes basados en la producción de TBARS a partir de 2-desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1981) y en la hidroxilación del ácido 4-hidroxibenzoico (Forney et al., 1982).

Cuando los radicales  $\cdot\text{OH}$  reaccionan con la 2-desoxirribosa se producen rupturas de enlaces, conduciendo principalmente a la producción de aldehídos que reaccionan con el TBA. La concentración de 2-desoxirribosa presente en las reacciones enzimáticas e incubaciones de los hongos en las que se estimó la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  fue de 2,8 mM. El procedimiento utilizado fue el siguiente: a 0,5 ml de muestra se añadieron 0,25 ml de ácido tricloroacético, preparado al 2,8 % en agua, y 0,25 ml de TBA, preparado al 1% en NaOH 50 mM; esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 100°C y, una vez enfriada, se midió la absorbancia a 532 nm.

Por otro lado, la hidroxilación del ácido 4-hidroxibenzoico por los radicales  $\cdot\text{OH}$  produce ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico), cuyos niveles se estimaron por HPLC. La concentración de ácido 4-hidroxibenzoico presente en las reacciones enzimáticas e incubaciones de los hongos fue de 1 mM. Las muestras (2  $\mu\text{l}$ ) se inyectaron en una columna de fase reversa (ACE 3 C18 PFP 50 x 2,1 mm), equilibrada con ácido fórmico al 1% a un flujo de 0,5 ml/min y 30 °C. El ácido protocatecuico se eluyó con el siguiente gradiente de metanol.

Tiempo (min)	Metanol (%)
0	2
2	2
4	5
9	5
9,1	2
14	2

La detección de los compuestos eluidos de la columna se realizó a 280 nm y las áreas de los picos correspondientes al ácido 4-hidroxibenzoico y al ácido protocatecuico se convirtió en concentración usando una curva patrón de los compuestos comerciales (50-500  $\mu\text{M}$ ). Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas fueron las siguientes:

Ácido 4-Hidroxibenzoico       $\text{Area}_{280} = 0,422 c$       ( $r = 0,99$ ;  $c = \mu\text{M}$ )

Ácido Protocatecuico       $\text{Area}_{280} = 0,506 c$       ( $r = 0,99$ ;  $c = \mu\text{M}$ )

## 2.7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 2.7.1. Actividad lacasa

La actividad de la enzima presente en soluciones fue valorada empleando como sustrato, 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) midiendo el incremento de absorbancia a 469nm ( $\epsilon_{469} = 27.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). En el caso de la lacasa asociada a micelio se empleó como sustrato 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) 200  $\mu\text{M}$  midiendo el incremento de absorbancia a 436 nm ( $\epsilon_{436} = 29.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), realizando para ello una reacción *in vivo* con una cantidad apropiada de micelio lavado en matraces de 100 ml de capacidad con 34 ml de tampón fosfato 20 mM, pH 5. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto.

### 2.7.2. Actividad quinona reductasa

Para medir la actividad quinona reductasa se empleó 1,4-benzoquinona (BQ) 0,5 mM, disuelta en tampón fosfato 20 mM al pH al cual quisiese detectarse esta actividad. La incubación se llevó a cabo con cantidades apropiadas del microorganismo y se tomaron muestras cuyo pH fue ajustado 2 con una solución de ácido fosfórico 7,4 M (10  $\mu\text{M}$  por cada ml de muestra). Una vez



diluidas las muestras (10 veces), se midió la absorbancia al máximo de absorción de luz UV de la quinona (247 nm). El coeficiente de extinción molar utilizado para calcular el descenso de la concentración de BQ fue el siguiente:  $\epsilon_{247} = 21.028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Gómez-Toribio, 2006). La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1  $\mu\text{mol}$  de BQ por minuto.

### **2.7.3. Actividad peroxidasa**

La actividad peroxidasa fue valorada empleando el mismo sustrato y condiciones que la lacasa extracelular, incluyendo 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **2.7.4. Actividad manganeso peroxidasa**

La actividad manganeso peroxidasa extracelular se valoró utilizando como sustrato  $\text{MnSO}_4$  0,1 mM en tampón tartrato 100 mM, pH 5,0, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ , midiendo el incremento de absorbancia a 238 nm debido a la producción del complejo  $\text{Mn}^{3+}$ -tartrato ( $\epsilon_{238} = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## **2.8. INDUCCIÓN, PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA LACASA**

La lacasa se indujo mediante la adición de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  el tercer día de cultivo. Después de 15 días, el líquido de cultivo se separó del micelio por filtración. A continuación, este líquido se concentró 7,5 veces y dializó frente a tampón acetato 10 mM, pH 4,5, por ultrafiltración a través de membranas con un corte de poro de 5 kDa (Filtron). La lacasa presente en este crudo enzimático fue purificada por cromatografía de intercambio iónico (cartucho Q, Biorad), utilizando como fase móvil tampón acetato 10 mM, pH 4,5, a un flujo de 1  $\text{ml min}^{-1}$ . Las proteínas retenidas fueron eluidas con un gradiente de NaCl de 0 a 350 mM durante 50 min. Fracciones de 2 ml fueron recogidas en tubos que contenían 0,15 ml de tampón fosfato 500 mM, pH 7, ya que al pH de la fase móvil la lacasa es menos estable. Las fracciones que contenían la actividad lacasa se mezclaron y se conservaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. Esta preparación de lacasa purificada contiene una mezcla de las dos formas isoenzimáticas que produce *C. rigida* (Saparrat et al., 2002).

## **2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Todos los resultados de experimentos biológicos y análisis de muestras incluidos en el presente trabajo son el resultado de la media de tres réplicas. En las figuras en las que se observan barras de error, éstas se corresponden con la desviación estándar de las réplicas.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 3.1. CICLOS REDOX DE QUINONAS

Para profundizar en el conocimiento del mecanismo inducible en microorganismos de producción extracelular de  $\cdot\text{OH}$  basado en el establecimiento de ciclos redox de quinonas, se seleccionaron como microorganismos representativos de basidiomicetos de podredumbre blanca y parda a *Coriolopsis rigida* y *Gloeophyllum trabeum*, respectivamente. Asimismo, para comprobar la existencia del mecanismo en otros grupos de microorganismos, se eligieron los ascomicetos *Aspergillus nidulans* y *Penicillium oxalicum*, y las bacterias *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli*. Los resultados que se incluyen en este apartado responden a la experimentación realizada para lograr los tres primeros objetivos de la tesis.

#### 3.1.1. *Coriolopsis rigida*

La inducción en hongos de podredumbre blanca la producción extracelular de  $\cdot\text{OH}$ , vía ciclos redox de quinonas, solo ha sido estudiada en profundidad en *P. eryngii* y *T. versicolor* (Aranda et al., 2010; Gómez-Toribio et al., 2009a; Gómez-Toribio et al., 2009b; Marco-Urrea et al., 2009). Para contribuir en el presente estudio al conocimiento de este mecanismo de producción de  $\cdot\text{OH}$ , se seleccionó al hongo *Coriolopsis rigida* por su demostrada eficacia para degradar materiales lignocelolúscos y compuestos contaminantes, produciendo únicamente enzimas de tipo lacasa (Saparrat et al., 2014). Estudios *in vitro* realizados con las dos isoenzimas de lacasa purificadas que produce este hongo, demostraron que la oxidación de 3-metoxi-1,4-benzohidroquinona por estas enzimas desencadena la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y, en reacciones que contenían  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA,  $\cdot\text{OH}$  (Saparrat et al., 2002). Resultaba pertinente, por tanto, comprobar en el hongo la existencia de ciclos redox de quinonas productores de  $\cdot\text{OH}$ , que pudieran formar parte de su sistema degradativo.

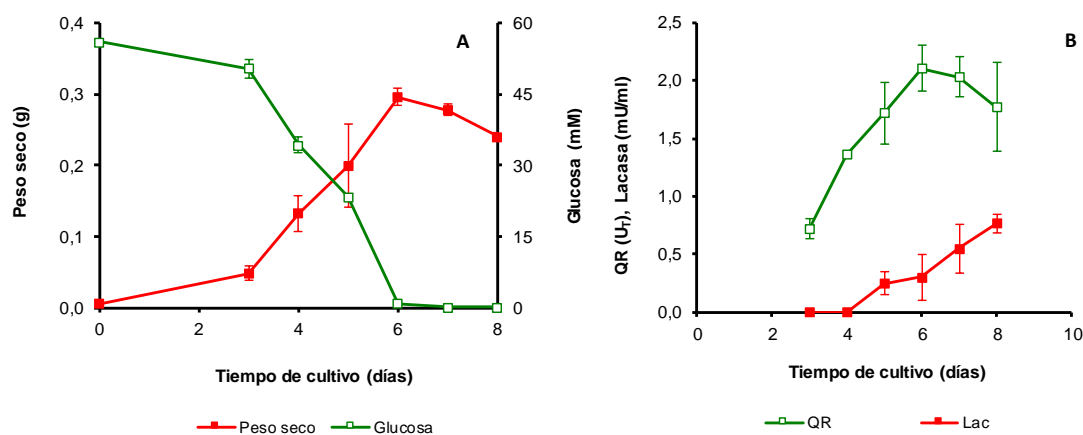
##### 3.1.1.1. Condiciones de cultivo de *C. rigida*

Para poder inducir en *C. rigida* la producción de  $\cdot\text{OH}$  a través de ciclos redox de quinonas era necesario encontrar unas condiciones de cultivo en las que se expresaran simultáneamente las actividades lacasa y QR. Para ello, se comprobó si utilizando las mismas condiciones de cultivo en las que se había descrito la producción de lacasa (Saparrat et al., 2002) el hongo también producía la reductasa intracelular.

Las fases de la curva de crecimiento de *C. rigida*, cultivado en el medio Czapek-Dox suplementado con extracto de levadura y peptona se muestran en la figura 3.1. Además del peso seco de micelio, se analizó el consumo de glucosa. Hasta el día 3 se observa una primera fase de adaptación al medio y a las condiciones de cultivo (fase de latencia), puesta de manifiesto por un ligero incremento del peso del hongo y un lento consumo de glucosa. A continuación, comienza la fase de crecimiento activo (trofofase) hasta el día 6, en el que el micelio alcanza el peso máximo. Dicho día coincide con el agotamiento de la glucosa, indicando que este nutriente es el limitante del crecimiento del hongo. Agotada la glucosa, el peso seco del micelio desciende progresivamente hasta el final del periodo de cultivo estudiado, poniendo de manifiesto la ausencia de una fase estacionaria o idiofase y el comienzo de la fase de muerte o autólisis.

En paralelo a la producción de micelio y consumo de glucosa, se valoraron las actividades quinona reductasa y lacasa (figura 3.1). La producción de quinona reductasa intracelular se observó a lo largo de todo el tiempo de cultivo, mostrando los niveles más altos de actividad el día 6. La progresión de los niveles de enzima siguió el mismo patrón que el peso del micelio, lo que sugiere que se trata de una enzima constitutiva ligada al crecimiento del hongo. En cuanto a la producción de lacasa, los niveles basales detectados (inferiores a 1 mU/ml en todas las

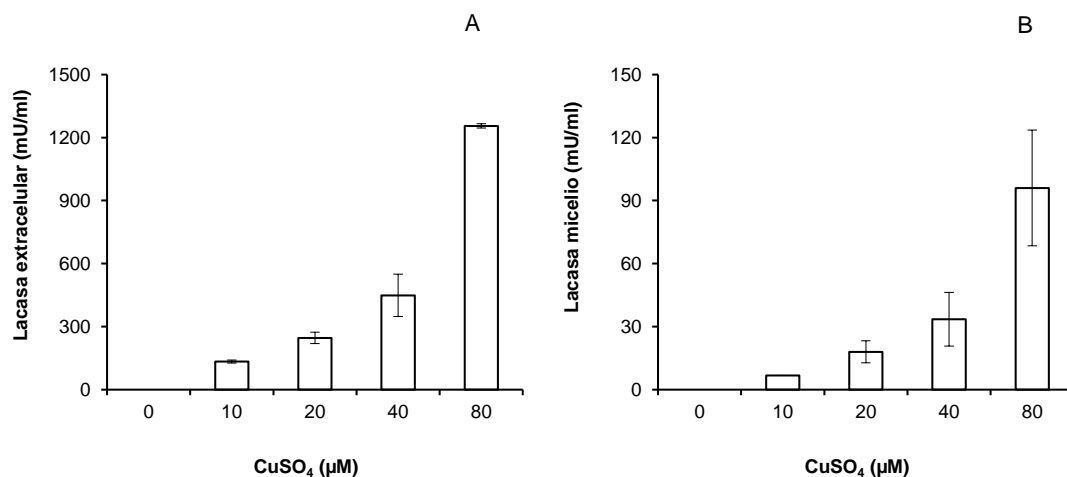
muestras) coinciden con los descritos previamente cuando no se induce su expresión con cobre (Saparrat et al., 2002). Puesto que unos niveles tan bajos de lacasa dificultarían el estudio de la implicación de esta enzima en la producción de radical hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas, se decidió inducir su expresión, fijando el sexto día de cultivo para el análisis de los resultados, ya que es cuando el hongo produce los niveles más altos de quinona reductasa. En estudios previos de ciclos redox de quinonas realizados con *P. eryngii* y *T. versicolor*, los niveles de lacasa utilizados oscilaron entre 50 y 250 mU/ml (Gómez-Toribio et al., 2009b; Marco-Urrea et al., 2009).



**Figura 3.1.** Evolución del peso del micelio y consumo de glucosa (A), y actividad QR y lacasa durante el cultivo de *C. rigida* en medio Czapek Dox suplementado con peptona y extracto de levadura. El cultivo se realizó en matraces de 100 ml de capacidad con 40 ml de medio de cultivo.

### 3.1.1.2. Inducción de la lacasa y efecto del pH sobre su actividad y estabilidad

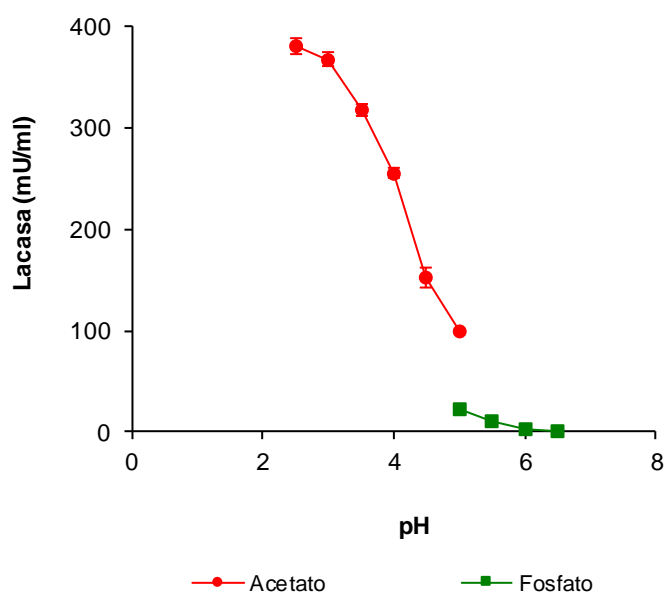
Para aumentar los niveles de lacasa producida por *C. rigida* se añadieron diferentes concentraciones de cobre el tercer día de cultivo (Saparrat et al., 2002). Además de valorar la lacasa extracelular, se determinó la que queda asociada al micelio después de ser lavado con agua, ya que los experimentos de inducción de radical hidroxilo con quinonas y hierro conviene realizarlos con micelio lavado para evitar subestimaciones en la determinación de sus niveles, debido al secuestro de los mismos por los componentes del medio de cultivo (García-Martín, 2017). Estudios de inmunolocalización de enzimas realizados con otros hongos ligninolíticos han puesto de manifiesto que parte de las enzimas extracelulares que producen estos hongos se encuentran localizadas en el entramado formado por el polisacárido que rodea las hifas (Barrasa et al., 1998). La figura 3.2 muestra en el gráfico de la izquierda la actividad lacasa extracelular y en el de la derecha la asociada al micelio. En ambos casos, los niveles de actividad producidos mostraron una correlación positiva con la concentración de cobre utilizada para inducir su expresión. Así, por ejemplo, los niveles más altos alcanzados con la mayor concentración de cobre utilizada (80  $\mu$ M) fueron 1256 mU ml<sup>-1</sup> de lacasa extracelular y 96 mU ml<sup>-1</sup> de lacasa asociada al micelio (la actividad de esta última se expresa en relación al volumen de cultivo con objeto poder comparar sus niveles con los de la enzima extracelular).



**Figura 3.2.** Efecto de diferentes concentraciones de cobre en la producción de lacasa extracelular (A) y asociada al micelio (B) por *C. rigida*. La adición de cobre se realizó al tercer día de cultivo del hongo.

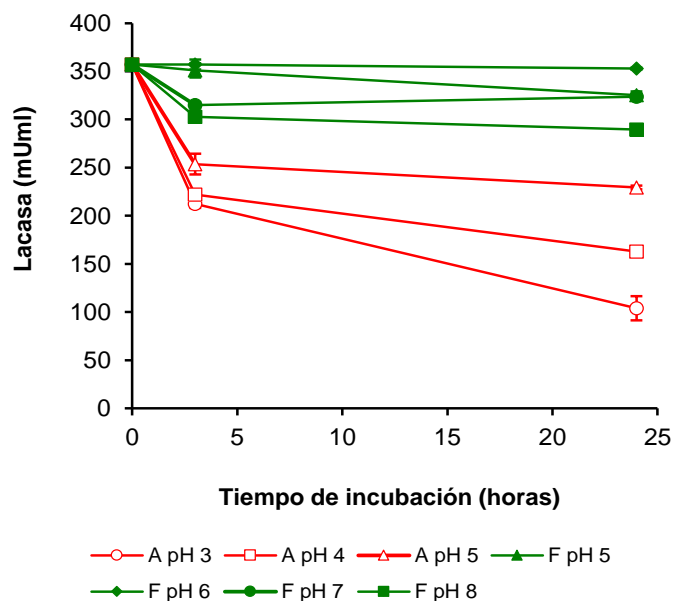
Con objeto de obtener información relevante para la realización de estudios posteriores, se purificó parcialmente la lacasa, hasta la obtención de una preparación enzimática que contiene mayoritariamente las dos formas isoenzimáticas de lacasa que produce *C. rigida* (Saparrat et al., 2002) y se analizó el efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las mismas.

Para determinar el pH óptimo de la lacasa se valoró su actividad a distintos valores de pH, empleando tampón fosfato y acetato, y 2,6-DMP como sustrato. Los niveles más altos de actividad se obtuvieron al menor valor de pH ensayado, 3,0, y fueron descendiendo progresivamente al aumentar el pH, como se muestra en la figura 3.3. También se observó un descenso de actividad al emplear tampón fosfato en lugar de acetato a pH 5.



**Figura 3.3.** Efecto del pH sobre la actividad lacasa. Las reacciones se llevaron a cabo empleando 2,6-DMP 5mM como sustrato.

El estudio de estabilidad de la enzima frente al pH se llevó a cabo mediante incubaciones de la misma a valores de pH comprendidos entre 3,0 y 8,0 durante 3 y 24 horas a 25 °C. Los resultados, ilustrados en la figura 3.4, mostraron que la enzima era menos estable a valores de pH más ácidos, en los cuales se había detectado una mayor actividad, y más estable al aumentar el pH. El tampón empleado tuvo un gran efecto sobre el parámetro analizado, dado que se obtuvieron los valores más altos de actividad al mantener la enzima en tampón fosfato, sin observarse grandes diferencias entre los valores de pH 5,0-7,0. A pH 8,0 se observó un ligero efecto negativo sobre la estabilidad de la enzima.



**Figura 3.4.** Estabilidad de la actividad lacasa a distintos valores de pH. Las incubaciones se llevaron a cabo con 350mU/ml de la enzima purificada en tampón acetato (A) y fosfato (F) con una concentración 200mM. La valoración de la actividad se realizó en tampón acetato 100mM pH 4,5, empleando 2,6-DMP 5mM como sustrato y 50µl de las incubaciones de la enzima a cada valor de pH.

En base a los resultados de estos experimentos se decidió emplear tampón acetato pH 4,5 para las reacciones *in vitro* de la lacasa, como compromiso entre actividad y estabilidad de la enzima.

### 3.1.1.3. Oxidación de compuestos de tipo siringilo por la lacasa: producción de 2,6-DBQ

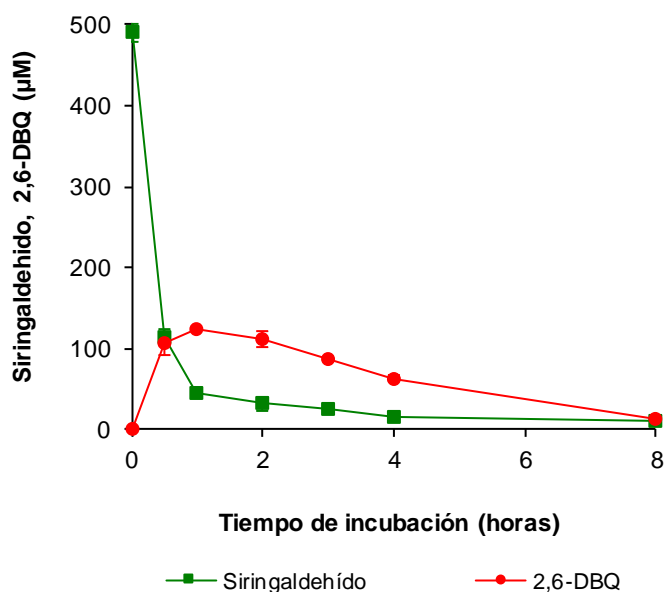
Entre las quinonas derivadas de la despolimerización de la lignina, la que induce en los hongos la producción de niveles más altos de  $\cdot\text{OH}$  es la 2,6-DBQ (Gómez-Toribio et al., 2009b). Esta quinona se produce cuando las enzimas u otros agentes ligninolíticos oxidan las unidades siringilo de la lignina y los radicales resultantes sufren ruptura alquil-arílica (Schoemaker, 1990). Alternativamente, la 2,6-DBQ puede derivar de la oxidación de otros productos de despolimerización de la lignina de tipo siringilo que conservan parte de la cadena lateral, como ácidos, aldehídos y cetonas (Leonowicz et al., 1984). Con objeto de comprobar si la lacasa de *C. rigida* puede participar en la producción de 2,6-DBQ mediante esta segunda vía, se determinó su actividad sobre ácido siríngico, siringaldehído y acetosiringona. Tras 24 horas de reacción, se analizó la producción de 2,6-DBQ por HPLC, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 3.1. En los cromatogramas de las muestras se observó que los compuestos de partida habían sido completamente oxidados y que la 2,6-DBQ no fue el único producto de oxidación. Los mayores porcentajes de producción de 2,6-DBQ en función de la concentración inicial de los

compuestos (1 mM) se obtuvieron con ácido siríngico (45,5%) y siringaldehído (28,7%). En el caso de la acetosiringona, la 2,6-DBQ no fue uno de los productos mayoritarios de oxidación, representando tan solo un 1,6%.

**Tabla 3.1. Producción de 2,6-DBQ mediante la oxidación de mediadores de la lacasa.** Las reacciones se realizaron en tampón acetato 20mM pH 4,5 y contenían los distintos mediadores con concentración 1 mM y 1 U/ml de lacasa.

Mediador	2,6-DBQ producida (µM)
Acetosiringona	10,6 ± 0,1
Siringaldehído	286,7 ± 1,7
Ácido siríngico	455,0 ± 4,2

Estos resultados obtenidos en reacciones *in vitro* se validaron *in vivo* en incubaciones del micelio de *C. rigida* de 6 días en el que se había inducido la producción de lacasa con 20 µM de cobre. La incubación se realizó con siringaldehído 500 mM durante 8 horas. En la figura 3.5 se muestra la evolución de los niveles de siringaldehído y de 2,6-DBQ producida como consecuencia de la actuación de la lacasa asociada a micelio. Durante la primera hora de incubación, el siringaldehído fue oxidado en un 76% y la cantidad de 2,6-DBQ producida en función del aldehído oxidado alcanzó un 27,7%, porcentaje similar al obtenido en las reacciones *in vitro* (28,7%). A partir de ese momento, los niveles de siringaldehído restantes y de la 2,6-DBQ generada fueron disminuyendo gradualmente hasta casi desaparecer a las 8 horas, poniendo de manifiesto la capacidad del hongo para metabolizar la quinona.



**Figura 3.5.** Conversión de siringaldehído a 2,6-DBQ por *C. rigida*. Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 500 µM de siringaldehído y 4,1 ± 0,3 mg/ml de micelio.

#### 3.1.1.4. Producción de ·OH por *C. rigida* vía ciclo redox de la DBQ

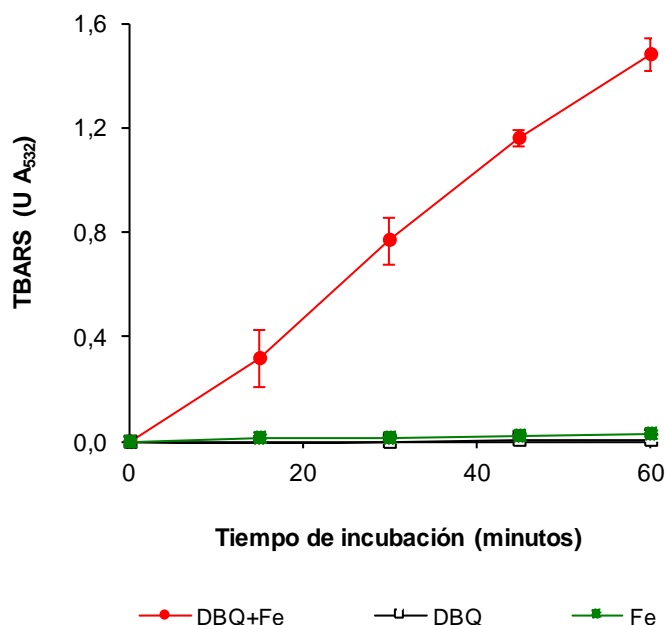
Una vez determinadas unas condiciones de cultivo del hongo bajo las que produce simultáneamente quinona reductasa y niveles apropiados de lacasa, y demostrada que esta última puede participar en la generación de quinonas, se procedió a comprobar si la incubación del hongo con 2,6-DBQ y Fe<sup>3+</sup>-EDTA desencadenaba la producción de radical hidroxilo.



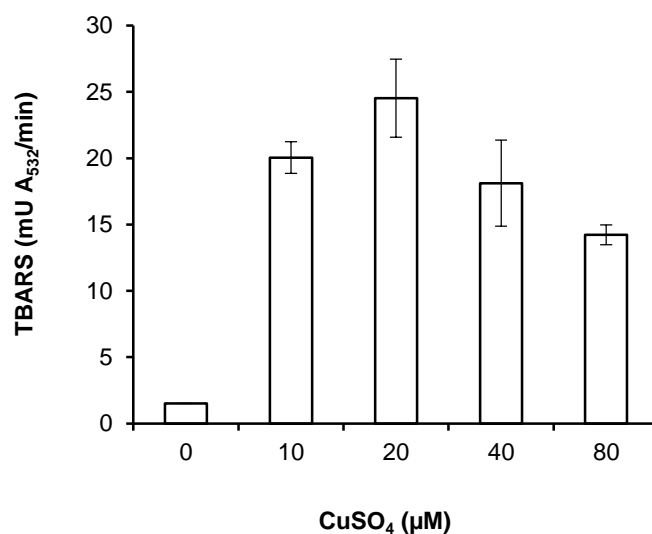
#### 3.1.1.4.1. Efecto de la concentración de lacasa

La posibilidad de inducir en *C. rigida* la producción de diferentes niveles de lacasa permitía evaluar el efecto de la concentración de la enzima en la producción de  $\cdot\text{OH}$ . Este estudio es de interés porque se ha descrito que cuando los niveles de lacasa sobrepasan un determinado umbral, disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno derivadas de la autooxidación de las semiquinonas (Gómez-Toribio, 2006), ya que la lacasa presenta una cierta actividad sobre estos compuestos (Guillén et al., 2000b).

El experimento se realizó con micelio producido en los mismos cultivos utilizados para determinar el efecto de la concentración de cobre sobre la producción de lacasa (figura 3.2), incubándolo en presencia de 2,6-DBQ y el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA y estimando la generación de radical hidroxilo como producción de TBARS a partir de 2-desoxirribosa (apartado 2.6.11). En todos los casos, se detectó la producción de radical hidroxilo de manera continua y lineal durante los 60 minutos que duró el experimento. Para ilustrarlo, en la figura 3.6 se muestran los resultados obtenidos con el micelio en el que se había inducido la producción de lacasa con 20  $\mu\text{M}$  de cobre. A partir de estos resultados se calculó una velocidad de producción de TBARS de  $25,3 \pm 1,4 \text{ mU A}_{532}/\text{min}$ . Este valor de velocidad y los obtenidos al inducir la lacasa con el resto de concentraciones de cobre se encuentran representados en la figura 3.7. Partiendo del valor más bajo de velocidad obtenido con micelio en el que no se había inducido la producción de lacasa ( $2,2 \pm 1,4 \text{ mU A}_{532}/\text{min}$ ), se observa que este parámetro se correlaciona positivamente con los niveles de lacasa, sólo hasta los que se obtienen con 20  $\mu\text{M}$  de cobre (246 y 18 mU/ml de lacasa extracelular y asociada al micelio respectivamente). Por tanto, esta fue la concentración que se utilizó para inducir la producción de la enzima en la mayoría de los experimentos que se realizaron con posterioridad.



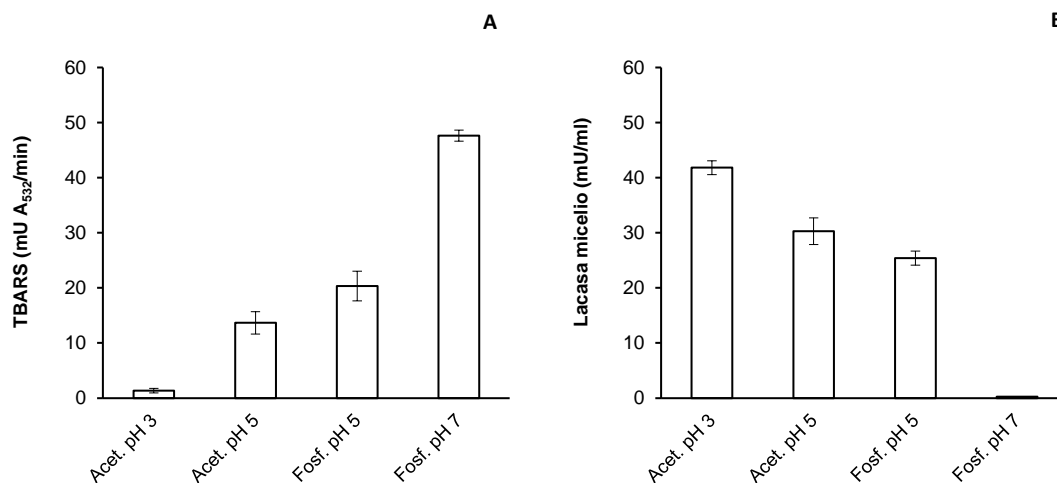
**Figura 3.6** Producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  por *C. rigida*, empleando micelio con lacasa inducida (20  $\mu\text{M}$  de cobre). Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5 con 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  EDTA 110  $\mu\text{M}$  y  $4,1 \pm 0,4 \text{ mg/ml}$  de micelio. Los controles carecían de 2,6-DBQ (Fe) o del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA (DBQ).



**Figura 3.7.** Efecto de la inducción de lacasa con diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub> sobre la producción de radicales ·OH. Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5 con 2,6-DBQ 500 µM, 2-desoxirribosa 2,8 mM, FeCl<sub>3</sub> 100 µM EDTA 110 µM y 6,3 ± 0,1 mg/ml de micelio cultivado en el que se indujo la producción de lacasa con las concentraciones indicadas.

#### 3.1.1.4.2. Efecto del pH y de la naturaleza del tampón

A continuación, se procedió a evaluar el efecto del pH y la naturaleza del tampón sobre la producción de ·OH. La figura 3.8 muestra la velocidad de producción de TBARS junto con la actividad lacasa presente en cada uno de los casos. La velocidad más baja se obtuvo en la incubación realizada en tampón acetato a pH 3,0, coincidiendo con la mayor actividad lacasa. Este resultado concuerda con el descenso observado en la velocidad de producción de TBARS al sobrepasar un cierto nivel de lacasa. En cuanto a los resultados obtenidos a pH 5,0, cabe destacar la diferencia observada entre tampones en la velocidad de producción de TBARS, siendo esta inferior al emplear tampón acetato. Es probable que, en dicho tampón, en el que la actividad lacasa es mayor, también se superen los niveles óptimos para la producción de TBARS, si bien otra posible explicación sería que el tampón acetato secuestre ·OH en mayor medida que el fosfato. Por último, la mayor velocidad de producción de TBARS se obtuvo a pH 7, pese a la ausencia de actividad lacasa a ese valor de pH. Estudios previos han descrito que la 2,6-DBQH<sub>2</sub> puede ser oxidada por el O<sub>2</sub> a valores de pH superiores a 6, permitiendo el establecimiento del ciclo redox (Gómez-Toribio, 2006).



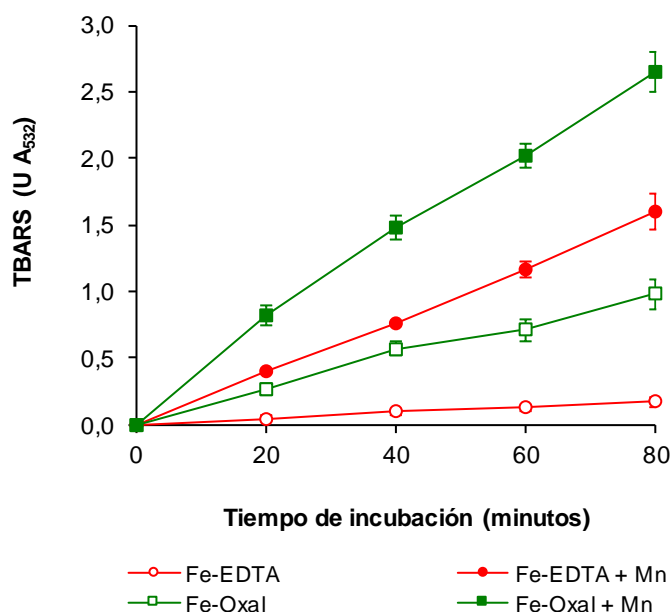
**Figura 3.8.** Efecto del pH sobre la producción de radicales ·OH y la actividad lacasa asociada a micelio. Las incubaciones se llevaron a cabo con 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M EDTA 110  $\mu$ M y 5,1  $\pm$  0,1 mg/ml de micelio en tampón acetato (Acet) o fosfato (Fosf) 20mM a los valores de pH indicados

#### 3.1.1.4.3. Efecto de agentes promotores de la oxidación de 2,6-DBQH<sub>2</sub> y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Los resultados mostrados en las figuras 3.7 y 3.8, permiten afirmar que la eficacia del ciclo redox de quinonas en la producción de ·OH depende de los niveles de las enzimas que lo catalizan y del pH del medio extracelular. Los estudios realizados con *P. eryngii* (Gómez-Toribio et al., 2009a) han descrito que los niveles de ·OH producidos por este mecanismo se pueden modular en función de la presencia en las incubaciones de iones que incrementan los niveles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producidos en el ciclo (Mn<sup>2+</sup>) y, cuando la reacción que limita la velocidad del mismo es la oxidación de la hidroquinona, de iones que oxidan esta última (Fe<sup>3+</sup> complejoado con oxalato y el Mn<sup>3+</sup> generado en la reacción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> con Mn<sup>2+</sup>). Puesto que el efecto de estos iones en la producción de ·OH se realizó con micelio de *P. eryngii* productor de unos niveles concretos de lacasa y a pH 5,0, en la presente investigación se consideró pertinente comprobar si dicho efecto era el similar en *C. rigida* en función de los niveles de lacasa producidos y el pH de la incubación. En concreto, se utilizó micelio con lacasa no inducida e inducida (cobre 20  $\mu$ M) en incubaciones con quinona a pH 5,0, y, por otro lado, micelio con lacasa inducida en incubaciones a pH 7,0.

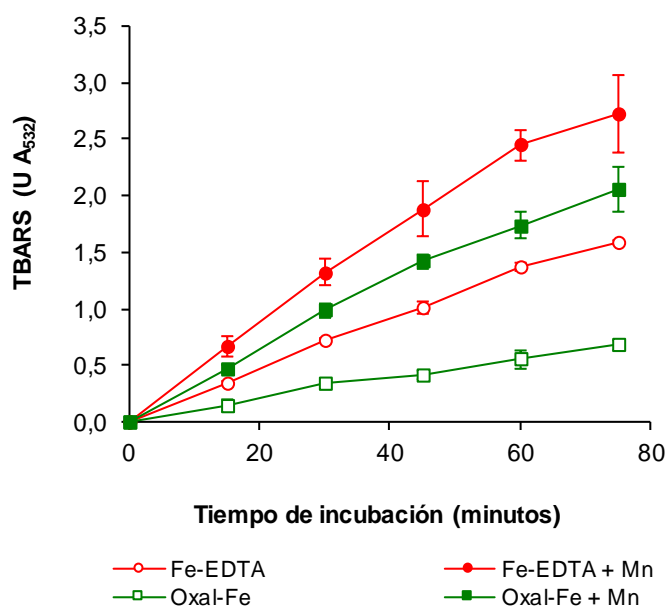
Utilizando micelio en el que no indujo la producción de lacasa y fosfato pH 5,0 en la incubación con 2,6-DBQ, la sustitución de Fe<sup>3+</sup>-EDTA, que no participa en la oxidación de la hidroquinona, por Fe<sup>3+</sup>-oxalato incrementó la velocidad de producción de TBARS de 2,2 a  $\pm$  0,4 a 12,1  $\pm$  1,3 mU A<sub>532</sub>/min (5,6 veces), valores calculados a partir de los resultados mostrados en la figura 3.9. Por otro lado, la presencia de Mn<sup>2+</sup> en las incubaciones con Fe<sup>3+</sup>-EDTA aumentó la velocidad hasta 19,8  $\pm$  1,6 mU A<sub>532</sub>/min, y en las incubaciones con Fe<sup>3+</sup>-oxalato hasta 32,5  $\pm$  1,9 mU A<sub>532</sub>/min (9,2 y 2,7 veces respectivamente). Estos resultados ponían de manifiesto que en ausencia o con niveles poco significativos de lacasa se requiere un oxidante de la hidroquinona para que se establezca el ciclo redox y la producción de ·OH sea eficaz. Este es el caso del ciclo redox de quinonas descrito en hongos de podredumbre parda, catalizado por la QR y el complejo Fe<sup>3+</sup>-oxalato (Kerem et al., 1999). Sin embargo, los resultados de la figura 3.9 amplían esta modalidad de ciclo redox, independiente de enzimas ligninolíticas, a condiciones naturales en las que el complejo de Fe<sup>3+</sup> sea ineficaz en la oxidación de hidroquinonas y se encuentre presente el Mn<sup>2+</sup>. Modalidad de ciclo redox que se podría denominar dependiente de Mn<sup>2+</sup>, y que como revelan

los resultados de la figura 3.9 es más eficaz en la producción de  $\cdot\text{OH}$  que la modalidad dependiente de  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato.



**Figura 3.9.** Producción de TBARS por *C. rigida* sin inducción de lacasa. Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5 con 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  o ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$  según los casos y  $4,7 \pm 2,75$  mg/ml de micelio. Las incubaciones con  $\text{Mn}^{2+}$  contenían  $\text{MnSO}_4$  100  $\mu\text{M}$ .

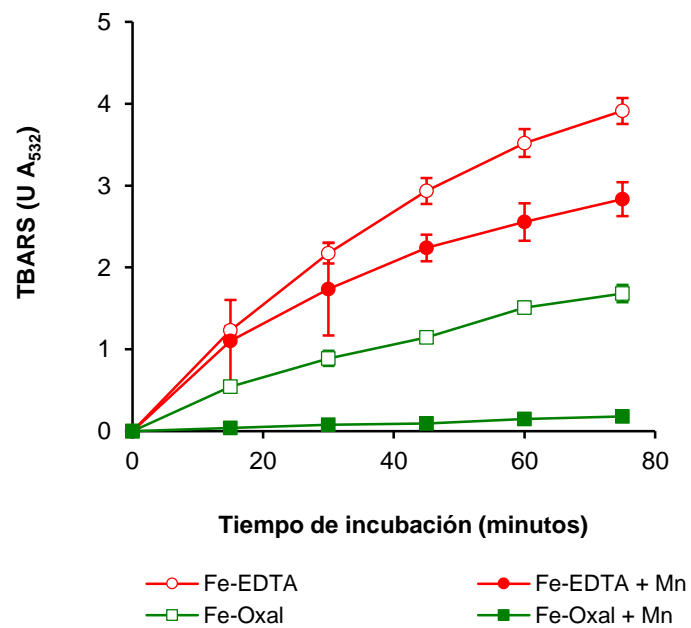
La figura 3.10 muestra los resultados obtenidos a pH 5,0 utilizando micelio del hongo en el que se había inducido la producción de lacasa. En este caso, el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA rindió mejores resultados que el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato, con una velocidad de producción de TBARS de  $21,6 \pm 0,5$  frente a  $8,9 \pm 0,5$  mU  $A_{532}/\text{min}$ . Es probable que, en estas condiciones, si la oxidación de la hidroquinona deja de limitar la velocidad del ciclo debido a la alta actividad lacasa, la presencia de un segundo oxidante de la hidroquinona no tenga un efecto positivo. Por otro lado, la detección de niveles más bajos de TBARS con  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato podría deberse a que el oxalato secuestra parte de los  $\cdot\text{OH}$  producidos (Barr et al., 1992; Cameron y Aust, 1999), mientras que el EDTA presenta limitada capacidad para ello (Halliwell y Gutteridge, 1986). La presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  en las incubaciones incrementó una vez más la velocidad de producción de TBARS, si bien en esta ocasión los efectos fueron menos patentes, especialmente al emplear  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA, donde el incremento de la velocidad fue de 1,7 veces frente a las 9,2 veces obtenidas al emplear micelio en los que no se había inducido la lacasa (figura 3.9). En las incubaciones realizadas con  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato el incremento causado por el  $\text{Mn}^{2+}$  en la velocidad de producción de TBARS (3,1 veces) fue similar al obtenido al utilizar micelio con lacasa no inducida (2,7 veces). Estos resultados ponen de manifiesto que si la oxidación de la hidroquinona se realiza de manera eficaz por la lacasa, de tal modo que la velocidad del ciclo redox se vea limitada por la actividad QR, la producción de  $\cdot\text{OH}$  solo se puede incrementar con agentes que promuevan la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como el  $\text{Mn}^{2+}$ .



**Figura 3.10.** Producción de TBARS por *C. rigida* con inducción de lacasa. Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5 con 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M o ácido oxálico 300  $\mu$ M según los casos y  $5,6 \pm 0,5$  mg/ml de micelio. Las incubaciones con  $\text{Mn}^{2+}$  contenían  $\text{MnSO}_4$  100  $\mu$ M.

Finalmente, el efecto del  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato y  $\text{Mn}^{2+}$  en la producción de  $\cdot\text{OH}$  también fue evaluado utilizando micelio con lacasa inducida, en incubaciones con la quinona a pH 7,0, condiciones en las que la lacasa no presenta actividad. Como muestra la figura 3.11, los mejores resultados se obtuvieron con el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA, con una velocidad de producción de TBARS muy superior a la que se había obtenido en todos los casos a pH 5,0 ( $50,9 \pm 0,3$  mU  $A_{532}/\text{min}$ ). Cabe resaltar que a pH 7,0 el efecto del  $\text{Mn}^{2+}$  fue negativo, especialmente en las incubaciones con complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato, en las que la producción de TBARS prácticamente se anula. Aunque conocer las causas de estos efectos negativos fuera de interés para interpretar los resultados, se consideró que las mismas son poco relevantes puesto que el valor de pH utilizado en las incubaciones se aleja mucho del óptimo de crecimiento y degradación de lignina de los hongos de podredumbre blanca. Sin embargo, el hecho de que a pH 7,0 se logre la mayor producción de  $\cdot\text{OH}$ , amplía el abanico de condiciones en las que se puede utilizar la inducción de  $\cdot\text{OH}$  en estos hongos para degradar compuestos contaminantes.

Además de comprobar por primera vez que *C. rigida* puede producir extracelularmente radicales  $\cdot\text{OH}$  vía ciclos redox de quinonas y, por tanto, contribuir a su capacidad degradativa, los resultados mostrados en este apartado han puesto de manifiesto que la lacasa juega un papel fundamental en la catálisis del ciclo, así como en el suministro de las quinonas que lo sustentan. Asimismo, han revelado que el mecanismo es muy versátil, ya que se muestra operativo con diferentes oxidantes de la hidroquinona, combinaciones de los mismos y condiciones de pH. De este modo, bajo un punto de vista básico, podría actuar en diferentes fases de degradación de la lignocelulosa, con independencia de que las enzimas puedan penetrar en su estructura y, en su aplicación a la degradación de contaminantes, se presta a ser modulado para conseguir en diferentes condiciones la mayor producción de  $\cdot\text{OH}$ .

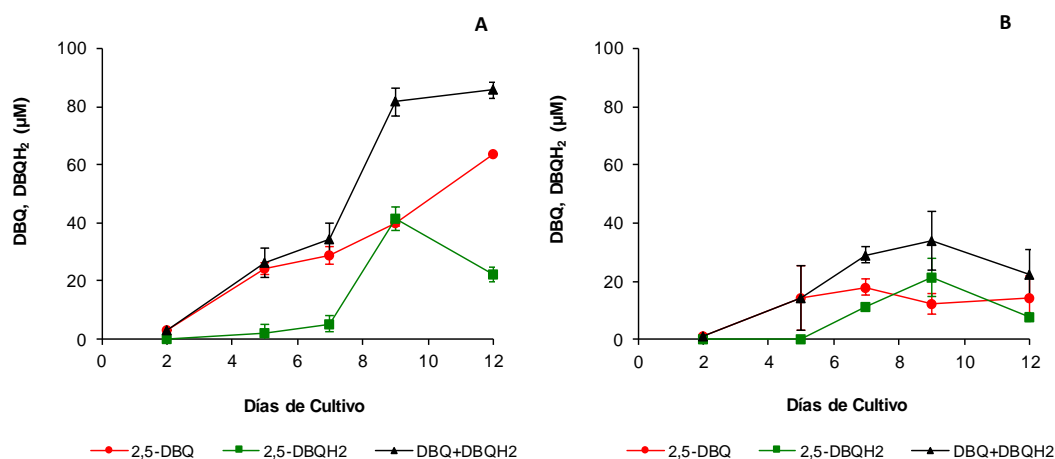


**Figura 3.11.** Producción de TBARS por *C. rigida* a pH 7. Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 7 con 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M o ácido oxálico 300  $\mu$ M según los casos y 5,3  $\pm$  0,4 mg/ml de micelio. Las incubaciones con Mn<sup>2</sup> contenían MnSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M.

### 3.1.2. *Gloeophyllum trabeum*

#### 3.1.2.1. Producción de quinonas implicadas en la producción de EROs por *G. trabeum*

Para el estudio de la inducción de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en *G. trabeum* se comenzó estableciendo unas condiciones de cultivo en las cuales se indujese la producción de 2,5-DBQ (Goodell et al., 1997b). Para ello se empleó el medio de Kirk, modificado, en condiciones en las que el nitrógeno actuase como factor limitante del crecimiento (HC/LN) y en condiciones en las que se encontrase en exceso, aumentando su concentración 10 veces (HN/HC) (Varela et al., 2003; Varela y Tien, 2003). Si bien en esta ocasión se retiró el  $\text{Mn}^{2+}$  del medio, se tamponó a pH 4,2 y se realizó el cultivo en agitación. En ambos medios se observó un incremento en la concentración de 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> a lo largo de los primeros 9 días de cultivo (figura 3.12), alcanzándose en este momento el máximo en la concentración de 2,5-DBQH<sub>2</sub>. Las diferencias entre ambos medios fueron patentes en los niveles de producción de la suma de hidroquinona y quinona, referida en lo sucesivo como 2,5-DBQ(H<sub>2</sub>), dado que los valores de concentración alcanzados en el medio con nitrógeno como elemento limitante fueron el doble a los del medio rico en nitrógeno. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Varela *et al.* (2003), donde las condiciones limitantes en nitrógeno también dieron lugar a los mayores niveles de



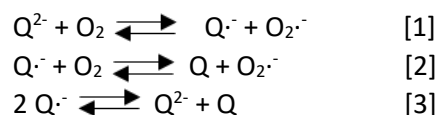
producción de 2,5-DBQ.

**Figura 3.12.** Producción de 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> en cultivos de *G. trabeum* en medio de Kirk HC/LN (A) y HC/HN (B). Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250ml de capacidad con 100ml de medio, a 28°C y 180rpm.

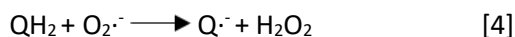
#### 3.1.2.2. Autooxidación de la 2,5-dimetoxibenzohidroquinona

Tras comprobar que efectivamente, *G. trabeum* producía 2,5-DBQ(H<sub>2</sub>) se procedió a estudiar *in vitro* su capacidad de autooxidación, así como el efecto de agentes promotores de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  cuyos efectos habían sido descritos previamente en estudios de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> en hongos ligninolíticos (Gómez-Toribio et al., 2009a).

Para que tenga lugar la oxidación de hidroquinonas (QH<sub>2</sub>) a quinonas (Q) por el O<sub>2</sub> deben darse dos pasos de transferencia de un electrón al O<sub>2</sub>, formándose semiquinonas (Q $\cdot^-$ ) como productos intermedios (reacciones 1 y 2). Las semiquinonas también se pueden transformar en quinonas vía dismutación (reacción 3).

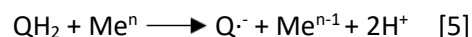


En el caso de algunas naftoquinonas se ha descrito que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  producido por autooxidación de las semiquinonas propaga la oxidación de las hidroquinonas (Ollinger et al., 1990) (reacción 4). Esta última reacción, que se demostró que no existía a pH 5 para la 2,6-DBQH<sub>2</sub> (Guillén et al., 2000b)(Guillen) ha sido recientemente demostrada en el caso de la 2,5-DBQH<sub>2</sub> (García-Martín, 2017).



Además del potencial redox, la autooxidación de las hidroquinonas y semiquinonas depende en buena medida del pH, ya que para que tengan lugar las reacciones de transferencia electrónica estos compuestos han de estar presentes en su forma aniónica (Stenken, 1979). El paso limitante de la reacción global es la autooxidación de las hidroquinonas, ya que el potencial redox y el pK de éstas son más altos que los de las semiquinonas correspondientes (Brunmark y Cadenas, 1989; Swallow, 1982). En relación con el pK, mientras que el de las hidroquinonas es superior a 9, el de las semiquinonas se encuentra comprendido entre 4 y 5.

La tabla 3.2 muestra las velocidades de autooxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub> y como era de esperar dado el pK de las hidroquinonas, al valor de pH del cultivo empleado para *G. trabeum* la velocidad de autooxidación es bastante baja, y solo incrementó de forma significativa en las reacciones llevadas a cabo a pH 7. También se incluyen en la tabla los resultados de reacciones realizadas en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , iones metálicos que fueron incluidos ya que pueden actuar como catalizadores de la oxidación de algunas hidroquinonas mediante el siguiente mecanismo de reacción (Li y Trush, 1993):



Además, en el caso del  $\text{Fe}^{2+}$  puede darse la siguiente reacción



La presencia de estos iones metálicos incrementó significativamente la velocidad de oxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub>, siendo dicho incremento especialmente relevante en el caso del  $\text{Mn}^{2+}$ , que a pH 7 aumentó 8 veces la velocidad de autooxidación de la hidroquinona.

El último agente promotor ensayado fue el ácido oxálico, debido a que es producido por los hongos y que puede formar complejos con algunos iones metálicos modificando su potencial redox (Henry, 2003). Esté no alteró la velocidad de autooxidación de manera significativa, pero si lo hizo en combinación tanto con  $\text{Fe}^{3+}$  como con  $\text{Mn}^{2+}$ , aumentándose dicha velocidad en todos los casos. Su combinación con  $\text{Fe}^{3+}$  fue especialmente efectiva a valores de pH ácidos, mientras que el aumento fue mucho menos evidente a pH 7. En el caso de las combinaciones con  $\text{Mn}^{2+}$ , se alcanzaron las mayores velocidades de oxidación para todos los valores de pH ensayados, lo que supone la primera evidencia del papel que puede jugar el  $\text{Mn}^{2+}$  en los ciclos redox de la DBQH<sub>2</sub>.



**Tabla 3.2. Efecto del pH, Fe<sup>3+</sup> y Mn<sup>2+</sup> y ácido oxálico sobre la velocidad de oxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub>.** Las reacciones fueron realizadas en tampón fosfato 20 mM con hidroquinona 50 μM. Las reacciones con Fe<sup>3+</sup> contenían FeCl<sub>3</sub> 50μM, aquellas con Mn<sup>2+</sup> MnSO<sub>4</sub> 100μM y la concentración de ácido oxálico fue de 150μM. Los valores mostrados son la media de tres reacciones, así como su desviación estándar..

pH	DBQH <sub>2</sub>	Quinona (μM/min)				
		Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>3+</sup> + Oxálico	Mn <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> + Oxálico	Oxálico
4,2	0,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	6,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	9,6 ± 0,4	1,4 ± 0,2
5	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	9,9 ± 0,1	5,1 ± 0,4	14,9 ± 0,5	0,8 ± 0,4
6	0,7 ± 0,0	4,3 ± 0,0	11,4 ± 0,3	17,0 ± 0,9	46,6 ± 5,8	0,8 ± 0,2
7	5,4 ± 0,1	14,2 ± 1,6	16,7 ± 2,3	41,6 ± 6,8	d.r*	5,9 ± 0,5

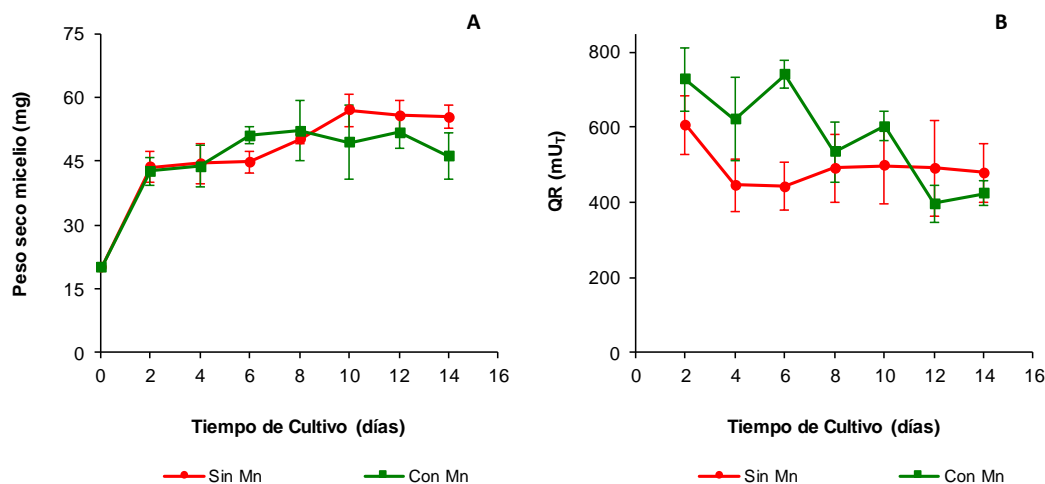
\* reacción demasiado rápida para calcular velocidad

### 3.1.2.3. Efecto del Mn<sup>2+</sup> sobre la producción de elementos necesarios para el establecimientos de ciclos redox de quinonas en *G. trabeum*

Para poder evaluar el efecto del Mn<sup>2+</sup> en la producción de especies reactivas de oxígeno a través de ciclos redox de quinonas en *G. trabeum* (segundo objetivo de la tesis) era necesario cultivar al hongo en ausencia de este catión y comprobar si en estas condiciones se veía afectado su crecimiento, así como los niveles de los necesarios para el establecimiento del ciclo redox de quinonas, como la QR, el ácido oxálico y el par redox 2,5-DBQH<sub>2</sub>/2,5-DBQ. El hongo se cultivó en medio de Kirk HC/LN en agitación a 180 rpm y 28 °C, puesto que en estas condiciones se habían producido los niveles más altos de 2,5-DBQ(H<sub>2</sub>).

#### 3.1.2.3.1. Crecimiento del hongo y producción de quinona reductasa

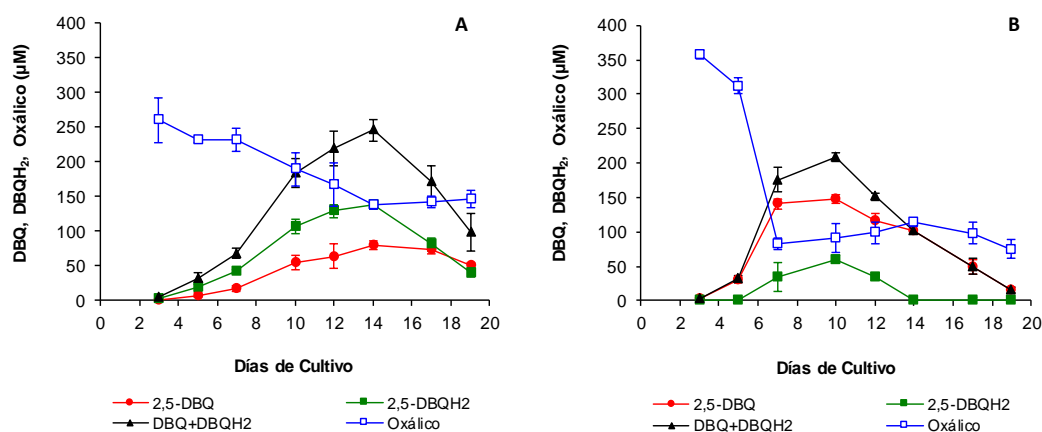
Q En una primera serie de experimentos se evaluó el efecto de suprimir el Mn<sup>2+</sup> en el crecimiento del hongo y la producción de QR. En la figura 3.13 se puede observar que la supresión del Mn<sup>2+</sup> del medio solo afectó a los niveles de QR, que fueron ligeramente inferiores durante los primeros días de cultivo. La máxima actividad QR se detectó en segundo día en el medio con Mn<sup>2+</sup>, alcanzando un valor de 605,9 ± 79,4 mU<sub>T</sub>. En ambas condiciones de cultivo, el hongo alcanzó su peso máximo el segundo día, en torno a un valor de 44 mg/matraz. La correlación positiva entre el peso y la actividad QR indicaban que, como en el caso de *C. rigida*, la enzima puede ser constitutiva.



**Figura 3.13. Evolución del peso (A) y actividad QR (B) de *G. trabeum* en medio de Kirk HC/LN, en ausencia o presencia de MnSO<sub>4</sub> 100μM.** El volumen de inóculo fue de 0,5mg/ml de cultivo y estos se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de medio, a 28°C y 180rpm.

### 3.1.2.3.2. Producción oxalato y del par redox 2,5-DBQH<sub>2</sub>/DBQ

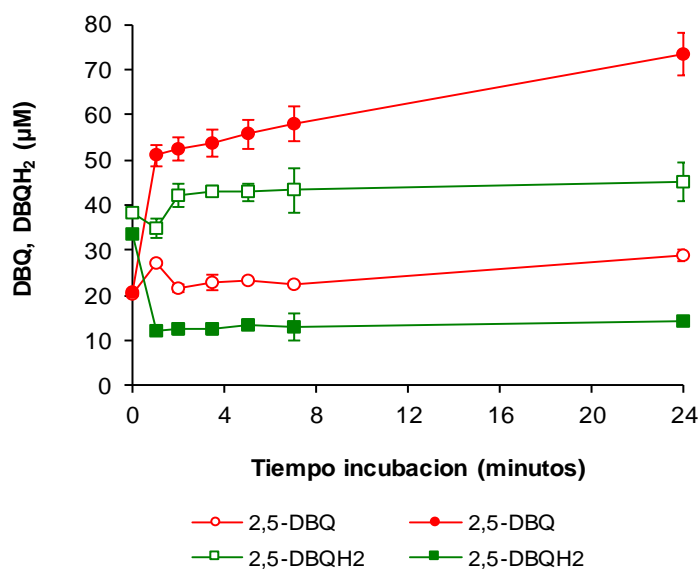
En una segunda serie de experimentos, cuyos resultados se muestran en la figura 3.14, se comprobó que el hongo produce ácido oxálico con independencia de que el medio de cultivo contenga Mn<sup>2+</sup>. Los niveles más altos del ácido se detectaron durante los dos primeros días de cultivo, siendo superiores en los cultivos con Mn<sup>2+</sup>. A partir del tercer día, dichos niveles disminuyeron progresivamente, sobre todo en el medio con Mn<sup>2+</sup> en el que se observó un descenso muy acusado entre los días 5 y 7. Por otro lado, también se comprobó que en ambas condiciones de cultivo, los niveles de 2,5-DBQ(H<sub>2</sub>) aumentaron de forma progresiva durante los primeros 10 días, prolongándose dicho aumento hasta los 14 días en el medio sin manganeso, momento en el que se alcanza una concentración máxima de 239,4 ± 12,4 μM, frente a los 206,2 ± 12,6 μM obtenidos el día 10 con Mn<sup>2+</sup>. Cabe resaltar la diferencia observada en la proporción hidroquinona:quinona entre ambos cultivos, siendo más alta (predominio de la hidroquinona) en el cultivo sin Mn<sup>2+</sup>, mientras que es mucho más baja (predominio de la quinona) en el cultivo que contenía Mn<sup>2+</sup>. Esta diferencia se podría explicar considerando que este catión cataliza la oxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub> por el O<sub>2</sub><sup>-</sup> derivado de la autooxidación de la semiquinona, como se había observado previamente *in vitro* (apartado 3.1.2.2).



**Figura 3.14. Producción de 2,5-DBQ, 2,5-DBQH<sub>2</sub> y ácido oxálico en cultivos de *G. trabeum* en medio de Kirk HC/LN, sin MnSO<sub>4</sub> (A) y con MnSO<sub>4</sub> (B).** Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250ml de capacidad con 100ml de medio, a 28°C y 180rpm. Los valores mostrados son la media de cinco cultivos así como su desviación estándar.

Como estrategia para confirmar que el Mn<sup>2+</sup> presente desde el inicio de los cultivos es el responsable de las distintas proporciones hidroquinona:quinona observadas, se analizó el efecto que tenía la adición de Mn<sup>2+</sup> a cultivos de 10 días realizados sin este catión sobre los niveles de 2,5-DBQH<sub>2</sub> y 2,5-DBQ. Los resultados, representados en la figura 3.15, muestran que efectivamente la adición de Mn<sup>2+</sup> conlleva la oxidación de 2,5-DBQH<sub>2</sub> a 2,5-DBQ, alcanzándose tras una hora valores estables de ambos compuestos, que indican que se ha alcanzado un nuevo equilibrio en el que predomina la quinona.

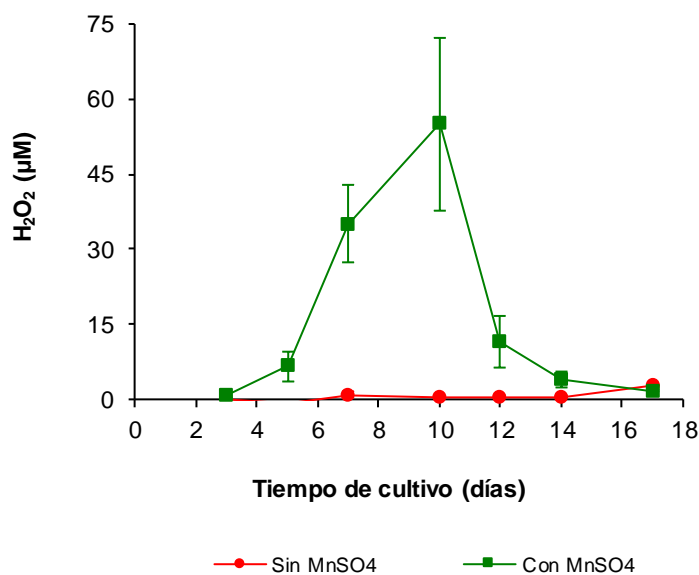
Con estos resultados quedaba demostrado que *G. trabeum* produce todos los componentes necesarios para los ciclos redox de quinonas, no solo cuando es cultivado en estático, sino también en cultivos agitados y, por otro lado, que la presencia de Mn<sup>2+</sup> en el medio no tiene grandes efectos en el crecimiento del hongo ni en la producción de los componentes del ciclo redox de la 2,5-DBQ. Además, los resultados de las figuras 3.14 y 3.15 rendían la primera evidencia del establecimiento de un ciclo redox de quinonas dependiente de Mn<sup>2+</sup> en un hongo de podredumbre parda.



**Figura 3.15. Efecto del manganeso en la proporción de 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> presente en cultivos de *G. trabeum* en medio de Kirk HC/LN.** Se muestra las concentraciones de 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> en cultivos en ausencia de Mn<sup>2+</sup> (símbolos vacíos) y tras la inclusión de MnSO<sub>4</sub> 100 μM (símbolos completos). Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250ml de capacidad con 100ml de medio, a 28°C y 180rpm.

### 3.1.2.3.3. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los cultivos

Con objeto de confirmar el establecimiento y operatividad del ciclo redox de la 2,5-DBQ en *G. trabeum*, se estimó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos del hongo realizados en ausencia y presencia de Mn<sup>2+</sup>. Dicha producción solo pudo observarse en aquellos cultivos que contenían Mn<sup>2+</sup>, tal y como se muestra en la figura 3.16. Cabe resaltar que los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectados se correlacionan bien con los de 2,5-DBQ(H<sub>2</sub>) presente en los cultivos (figura 3.14), alcanzando en ambos casos los máximos niveles el décimo día. En concreto, la concentración más alta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectada fue 55,0 ± 17,3 μM. La imposibilidad de detectar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los cultivos que no contenían Mn<sup>2+</sup> podría deberse a que el ciclo redox no se establece por la ausencia de un oxidante de la hidroquinona, o bien a la existencia de un sistema de consumo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido, como se ha descrito *P. eryngii* (Gómez-Toribio et al., 2009b), cuya capacidad superase a la de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del ciclo redox.



**Figura 3.16. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos de *G. trabeum* en medio de Kirk HC/LN, en ausencia y presencia de MnSO<sub>4</sub>.** Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250ml de capacidad con 100ml de medio, a 28°C y 180rpm. La concentración de MnSO<sub>4</sub> en las incubaciones que lo incluían fue de 100 µM.

Para comprobar la existencia de ese hipotético sistema de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *G. trabeum*, se realizó una incubación en tampón fosfato del micelio lavado del hongo procedente de un cultivo sin Mn<sup>2+</sup>, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM, siguiéndose la evolución de la misma durante 1 hora. En este experimento se utilizó micelio lavado para evitar cualquier interferencia que los componentes el líquido de cultivo pudieran ocasionar. Los resultados obtenidos, representados en la figura 3.17 demostraron que, efectivamente, dicho sistema existe en *G. trabeum*, puesto que prácticamente todo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue consumido. La velocidad de consumo, calculada con los datos obtenidos durante los primeros 15 minutos, fue de  $0,39 \pm 0,05$  µM/min por mg de micelio.

De modo similar al estudio del efecto de la adición de Mn<sup>2+</sup> a cultivos realizados en su ausencia sobre la proporción hidroquinona/quinona (figura 3.15), se realizó un ensayo similar para determinar el efecto sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, a cultivos de 11 días realizados en ausencia de Mn<sup>2+</sup>, se les añadió este catión y como controles se realizaron incubaciones sin añadir Mn<sup>2+</sup> al cultivo y añadiéndolo al líquido de cultivo separado del micelio por filtración. La figura 3.18 ilustra los resultados obtenidos. La adición de Mn<sup>2+</sup> al cultivo aumentó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuya concentración fue incrementando de forma lineal durante los primeros 40 minutos, para después mantenerse prácticamente constante, probablemente al alcanzarse un equilibrio con el sistema de consumo demostrado previamente. La velocidad de producción fue de  $0,43 \pm 0,03$  µM/min por mg de micelio. El control en ausencia de Mn<sup>2+</sup> no mostró producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posiblemente debido a la baja velocidad de oxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub> en ausencia de otros oxidantes. Por otra parte, los controles del líquido de cultivo y Mn<sup>2+</sup> mostraron un nivel inicial de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de aproximadamente 13 µM, que aumentó ligeramente durante el resto de la incubación. El aumento inicial observado puede ser debido a la rápida acción catalítica del Mn<sup>2+</sup> sobre la oxidación de la hidroquinona presente en el líquido por el O<sub>2</sub>.

Obviamente, la ausencia de micelio impide que se recicle la 2,6-DBQ producida y, por otro lado, evita que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado sea consumido.

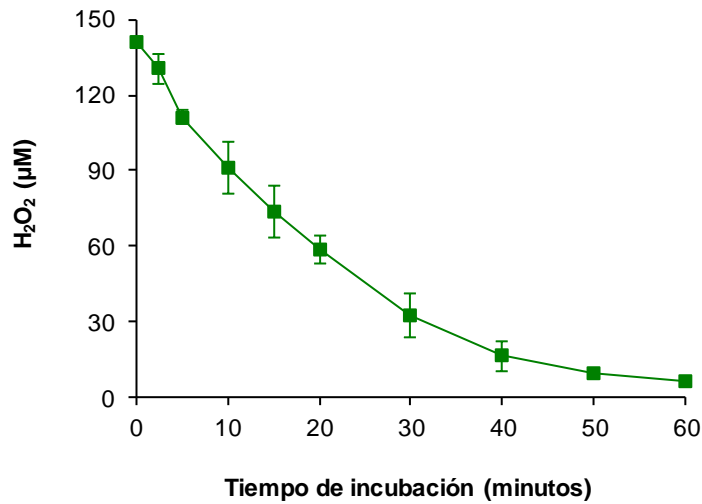


Figura 3.17. Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *G. trabeum*. Las incubaciones se realizaron con 0,35 ± 0,0 mg/ml de micelio, tampón fosfato 20mM, pH 4,2 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM, a 28°C y 180rpm.

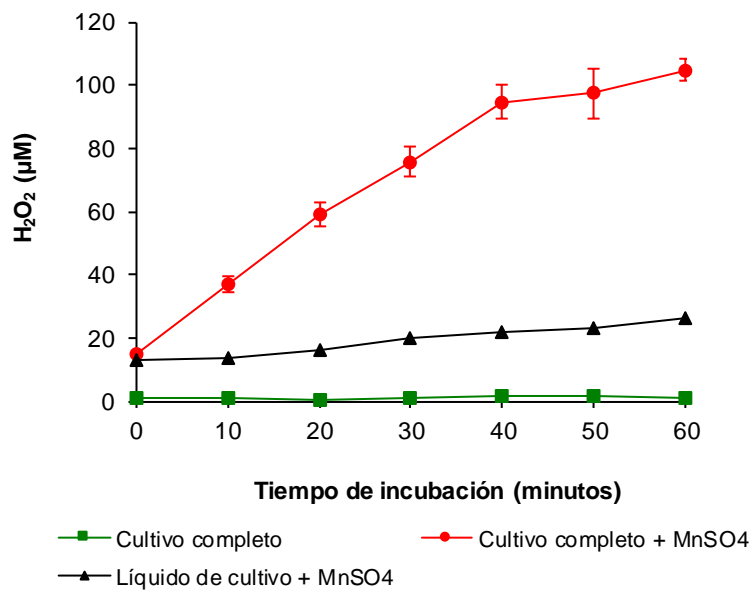
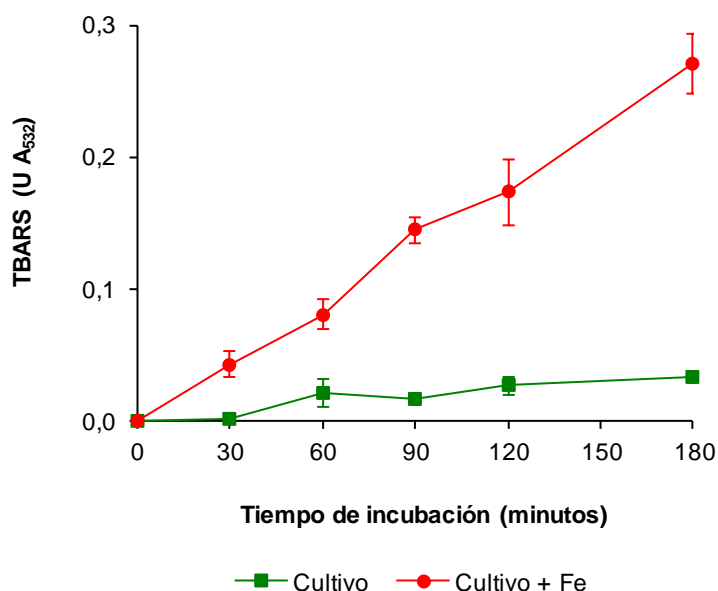


Figura 3.18. Efecto de la adición de Mn<sup>2+</sup> sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cultivo de *G. trabeum*. A cultivos de 11 días en medio HN/LC, a 28°C y 180rpm, que contenían 1,4 ± 0,1 mg/ml de micelio, les fue añadido MnSO<sub>4</sub> 100 µM, manteniendo a su vez controles en ausencia de dicho compuesto. También se incluye el efecto de la adición de MnSO<sub>4</sub> 100 µM al líquido de cultivo, separado del micelio por filtración.

### 3.1.2.3.4. Producción de $\cdot\text{OH}$ en los cultivos

La primera experiencia de inducción de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en *G. trabeum* se realizó añadiendo a un cultivo de 11 días  $\text{FeCl}_3$ , así como 2-desoxirribosa, a fin de que actuase como sonda para la detección del radical  $\cdot\text{OH}$  y permitiese su valoración mediante detección de TBARS. Bajo esas condiciones se observó producción de TBARS de forma lineal durante las 3 horas de experimento (figura 3.19), lo que permitió calcular una velocidad de producción de TBARS de  $1,6 \text{ mU } A_{532}/\text{min}$ . Este valor es mucho menor que el obtenido en otros hongos al emplear micelio lavado, por lo que era posible que se debiese al secuestro de  $\cdot\text{OH}$  por parte de los componentes del medio de cultivo. Mediante una serie de reacciones in vitro para producir el reactivo de Fenton a partir de  $\text{FeCl}_2$   $50 \mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100\mu\text{M}$ , así como 2-desoxirribosa, se observó que la adición del líquido de cultivo de 11 días empleado en el experimento anterior como 10% del volumen de reacción suponía un descenso del 66,7% de la producción de TBARS. Tan elevado porcentaje de secuestro podría dificultar el estudio del efecto del  $\text{Mn}^{2+}$  sobre la producción de  $\cdot\text{OH}$  (probablemente conduciendo a subestimaciones), por lo que se decidió realizar dichos estudios en incubaciones de micelio lavado con concentraciones conocidas de 2,5-DBQ.

Figura 3.19. Producción de TBARS por *G. trabeum* en el medio de cultivo. Al cultivo de 11 días, que contenía  $1,3 \pm$



0,1 mg de micelio le fue añadido  $\text{FeCl}_3$   $50 \mu\text{M}$  y 2-desoxirribosa  $2,8 \text{ mM}$ . La incubación se realizó a  $28^\circ\text{C}$  y 180rpm.

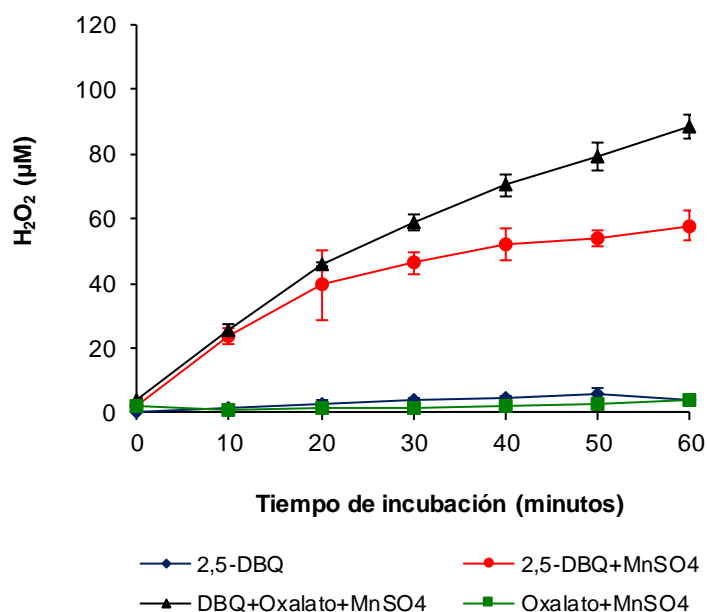
### 3.1.2.4. Evaluación del efecto de $\text{Mn}^{3+}$ sobre el ciclo redox de la 2,5-DBQ y la activación del oxígeno en incubaciones realizadas con micelio lavado de *G. trabeum*

#### 3.1.2.4.1. Producción del reactivo de Fenton

Como estrategia para confirmar el papel atribuido a cada uno de los elementos implicados en la producción de EROs en *G. trabeum* (2,5-DBQ,  $\text{Mn}^{2+}$  y ácido oxálico) y descartar el de otros que se encontrasen en el líquido de cultivo pudiendo causar interferencias en cualquiera de las reacciones implicadas en el mecanismo, se llevaron a cabo incubaciones de micelio lavado en tampón fosfato a fin de observar sus efectos por separado, así como en combinaciones de los mismos. Los resultados presentados en la figura 3.20 muestran que, al pH de la incubación (4,2), dos componentes son indispensables para la producción significativa de  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 2,5-DBQ, y  $\text{Mn}^{2+}$ , obviamente contando con la participación de la quinona reductasa. En este caso, la velocidad de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue de  $2,1 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$ . En los casos en los que no estaba presente

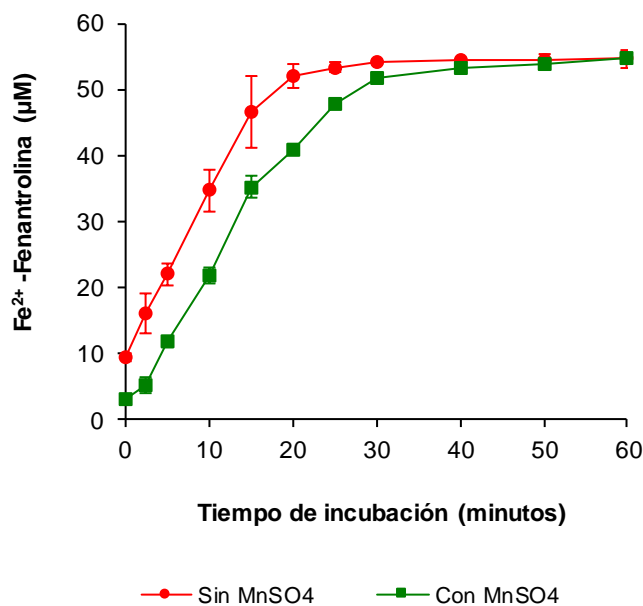
alguno de dichos elementos en la incubación no hubo producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , al menos a niveles que permitiesen superar la tasa de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del hongo. El oxalato por otra parte, sin ser indispensable, incrementó notablemente los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en combinación con  $\text{Mn}^{2+}$  y 2,5-DBQ, puesto que se alcanzó una concentración de  $88,7 \pm 3,7 \mu\text{M}$  tras 1 h de incubación frente a la concentración de  $57,7 \pm 4,6 \mu\text{M}$  alcanzada para el mismo periodo en ausencia de oxalato. Este fenómeno es debido probablemente a que, como demostraron los estudios *in vitro*, el complejo  $\text{Mn}^{2+}$ -oxalato es capaz de incrementar aún más la velocidad de oxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub>. Este resultado corrobora que es dicha reacción de oxidación la limitante en el proceso y resalta la importancia de un catalizador para su desarrollo.

**Figura 3.20. Producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por *G. trabeum* en incubaciones de micelio lavado.** Las incubaciones contenían 1,2



$\pm 0,0$  mg/ml de micelio de 11 días, tampón fosfato 20mM pH 4,2 y 2,5-DBQ 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnSO}_4$  100  $\mu\text{M}$  y ácido oxálico 150 $\mu\text{M}$  según los casos. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm.

A continuación, se procedió a estudiar el efecto del  $\text{Mn}^{2+}$  sobre la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$ . Con este fin, se incubó al hongo en presencia de  $\text{FeCl}_3$ , 2,5-DBQ y 1,10-fenantrolina, un quelante fuerte y específico de la forma reducida del hierro, con la que establece un complejo cuya formación puede valorarse espectrofotométricamente a 510 nm. Los resultados del experimento, mostrados en la figura 21, confirman la producción de  $\text{Fe}^{2+}$  en ambos casos, completándose en 40 min. Pese a que en el caso que contenía  $\text{Mn}^{2+}$  se observa cierta fase de retraso al iniciarse la reacción, la velocidad de formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -fenantrolina fue lineal desde los 2,5 hasta los 15 minutos de reacción, e igual en ambos casos,  $0,17 \pm 0,4$  y  $0,17 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$  por mg de micelio, sin y con  $\text{Mn}^{2+}$  respectivamente.



**Figura 21. Efecto del Mn<sup>2+</sup> en la reducción de Fe<sup>3+</sup> por *G. trabeum*.** Las incubaciones contenían 0,4 ± 0,0 mg/ml de micelio de 11 días, tampón fosfato 20mM pH 4,2, 2,5-DBQ 100 µM, 1,-10-fenantrolina 1,5 mM y ácido oxálico 150 µM. Los casos con Mn<sup>2+</sup> contenían a su vez MnSO<sub>4</sub> 100 µM. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm

#### 3.1.2.4.2. Producción de ·OH

En un nuevo ensayo con micelio lavado se estudió el efecto del Mn<sup>2+</sup> sobre la producción de ·OH (figura 3.22). En este caso se produjeron TBARS durante las 4 horas de experimento, alcanzándose valores de absorbancia muy superiores a los obtenidos con el cultivo completo (figura 3.19). Concretamente, la velocidad de producción de TBARS durante los primeros 90 minutos en la incubación sin Mn<sup>2+</sup> fue de 23,6 ± 0,2 mU A<sub>532</sub>/min. A diferencia de lo esperado en función del efecto positivo del Mn<sup>2+</sup> en la oxidación de la 2,5-DBQH<sub>2</sub> realizados *in vitro* (tabla 3.2) y en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figuras 3.18 y 3.20), la inclusión de Mn<sup>2+</sup> no resultó en un efecto positivo sobre la producción de radicales ·OH, con una velocidad inicial de producción de TBARS en 90 minutos de incubación de 18,3 ± 0,3 mU A<sub>532</sub>/min.

Durante el experimento de producción de TBARS se estudió también la evolución de las concentraciones de 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> a lo largo del ensayo (figura 3.23).

Tanto en el caso con Mn<sup>2+</sup> como sin este se aprecia un descenso en la concentración de 2,5-DBQ(H<sub>2</sub>), a velocidades calculadas a partir de la primera hora de incubación de 0,39 ± 0,06 y 0,43 ± 0,06 µM/min respectivamente, así como una predominancia de 2,5-DBQ sobre 2,5-DBQH<sub>2</sub> durante todo el experimento. La concentración total 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> disminuye en ambos casos a lo largo del ensayo, debido probablemente a su oxidación por los ·OH. La mayor degradación observada en las incubaciones en ausencia de Mn<sup>2+</sup> parece correlacionarse con la mayor producción de radicales ·OH obtenida en ese caso (Figura 3.22).

Estos resultados indicaban que, en todas las incubaciones, la reacción que limita la velocidad del ciclo y, por tanto, la de producción de ·OH, es la reducción de la quinona. Por tanto, si la velocidad de oxidación de la hidroquinona por el Fe<sup>3+</sup>-oxalato es superior a la de reducción de la quinona por la QR, la presencia de otro oxidante de la hidroquinona, como el Mn<sup>3+</sup>, no incrementaría la velocidad del ciclo redox. Incluso cabe la posibilidad de que ambos metales compitan en la oxidación de la hidroquinona, dando lugar a menores niveles de Fe<sup>2+</sup> y por tanto a una menor producción de TBARS.



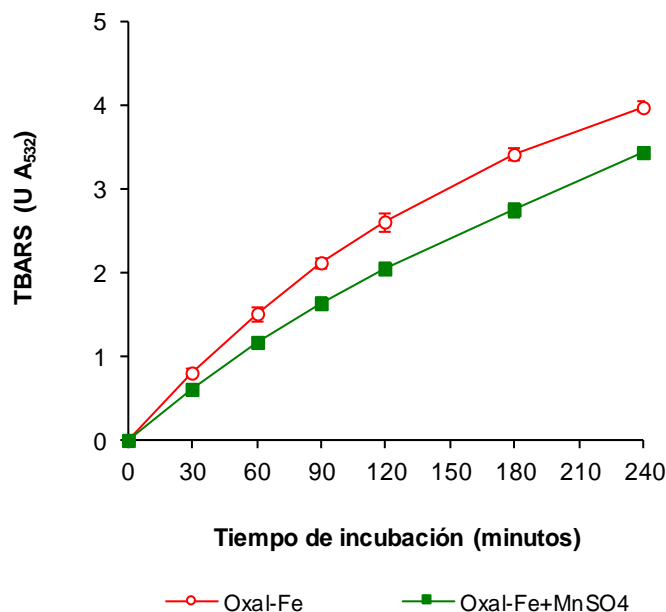


Figura 3.22. Efecto del  $Mn^{2+}$  en la producción de TBARS por *G. trabeum*. Las incubaciones contenían  $1,8 \pm 0,1$  mg/ml de micelio de 11 días, tampón fosfato 20mM pH 4,2, 2,5-DBQ 100  $\mu$ M,  $FeCl_3$  50  $\mu$ M, ácido oxálico 150 $\mu$ M y 2-desoxirribosa 2,8 mM. Los casos con  $Mn^{2+}$  contenían a su vez  $MnSO_4$  100  $\mu$ M. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm.

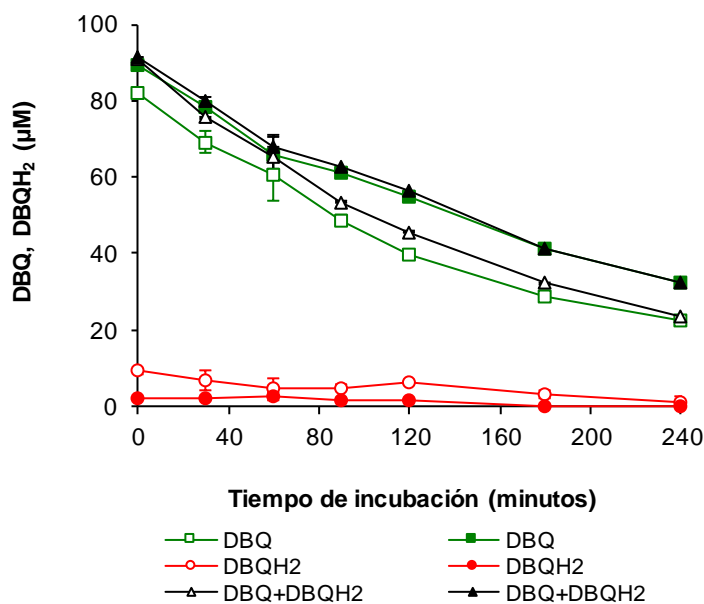
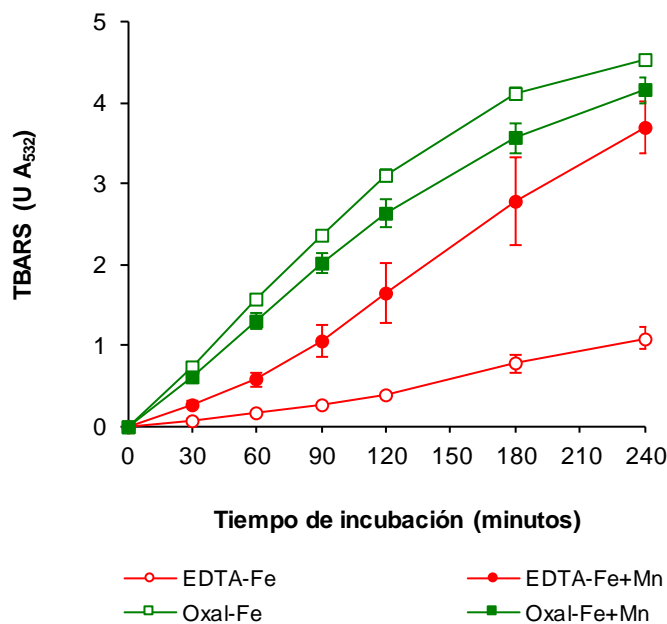


Figura 3.23. Evolución de 2,5-DBQ y 2,5-DBQH<sub>2</sub> en las incubaciones en condiciones de producción de  $\cdot OH$ , cuyos resultados se muestran en la figura 3.22. Las condiciones de incubación son las descritas en el pie de la figura 3.22.

Teniendo en cuenta las observaciones realizadas en el párrafo anterior, el efecto positivo del  $Mn^{2+}$  sobre la producción de  $\cdot OH$  se pudo demostrar finalmente al eliminar el complejo  $Fe^{3+}$ -oxalato de la incubación, dejando actuar exclusivamente al  $Mn^{3+}$  como oxidante de la 2,5-DBQH<sub>2</sub>. En estas condiciones, en las que se utiliza EDTA para quelar al  $Fe^{3+}$ , el  $Fe^{2+}$  necesario para

que tenga lugar la reacción de Fenton procedería únicamente de la reducción de este por los radicales semiquinona, por lo que el  $Mn^{2+}$  no influiría en los niveles de  $Fe^{2+}$ .

Los resultados de este experimento mostraron una baja producción de TBARS en las incubaciones realizadas con  $Fe^{3+}$ -EDTA y sin  $Mn^{2+}$ , como se muestra en la figura 3.24. La adición de  $Mn^{2+}$  a las mezclas de incubación con el complejo  $Fe^{3+}$ -EDTA incremento notablemente la velocidad de producción de TBARS de  $5,3 \pm 0,3$  a  $18,6 \pm 3,5$  mUabs/min. En las incubaciones con  $Fe^{3+}$ -oxalato se confirmó el efecto negativo del  $Mn^{2+}$ .



**Figura 3.24.** Producción de TBARS por *G. trabeum*. Las incubaciones contenían  $1,3 \pm 0,0$  mg de micelio de 11 días, tampón fosfato 20mM pH 4,2, 2,5-DBQ 100  $\mu$ M,  $FeCl_3$  50  $\mu$ M, quelado con ácido oxálico 150  $\mu$ M o EDTA 55  $\mu$ M y 2-desoxirribosa 2,8 mM. Los casos con  $Mn^{2+}$  contenían a su vez  $MnSO_4$  100  $\mu$ M. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm. Los valores mostrados son la media de tres incubaciones así como su desviación estándar.

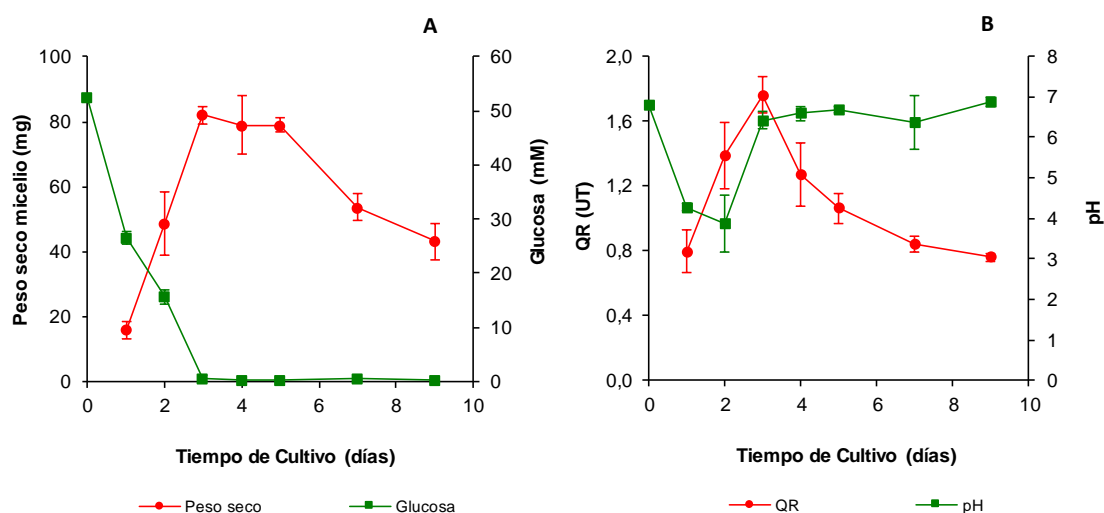
Estos resultados confirmaban por lo tanto el papel que puede desempeñar el  $Mn^{2+}$  en la producción de radicales  $\cdot OH$  en condiciones en las cuales un oxidante de la 2,5-DBQH<sub>2</sub> sea requerido para activar o acelerar su ciclo redox.

### 3.1.3. *Aspergillus nidulans*

#### 3.1.3.1. Crecimiento y expresión de enzimas implicadas en los ciclos redox de quinonas

El cultivo de *A. nidulans* se llevó a cabo en el medio definido que contiene glucosa como fuente de carbono, a 37°C y 180 rpm, empleando como inóculo 150 µl de una suspensión de esporas previamente obtenida a partir de cultivos en placa. En dichas condiciones, tanto el agotamiento de la fuente de carbono como el máximo peso del hongo se produjo el tercer día, como se muestra en la figura 3.25. La fase estacionaria se observó entre el tercer y quinto día de cultivo y a partir de ese momento comenzó la fase de autólisis que se extendió hasta el final del experimento. El pH inicial del medio, 6,8, Disminuyó durante los dos primeros días hasta un valor  $3,9 \pm 0,7$ , para retornar a valores muy similares a los de inicio a partir del tercer día del cultivo.

En cuanto a la presencia de enzimas que pudiesen participar en ciclos redox de quinonas no se detectaron ni lacasas ni peroxidases pero si a una QR capaz de reducir divalentemente la 1,4-benzoquinona empleada en los experimentos llevados a cabo para su valoración. El máximo de actividad de esta enzima se dio al tercer día de cultivo ( $1,76 \pm 0,11$  UT), coincidiendo con el máximo peso del hongo. En base a estos resultados se decidió emplear micelio de 3 días en los experimentos de inducción de radicales ·OH.



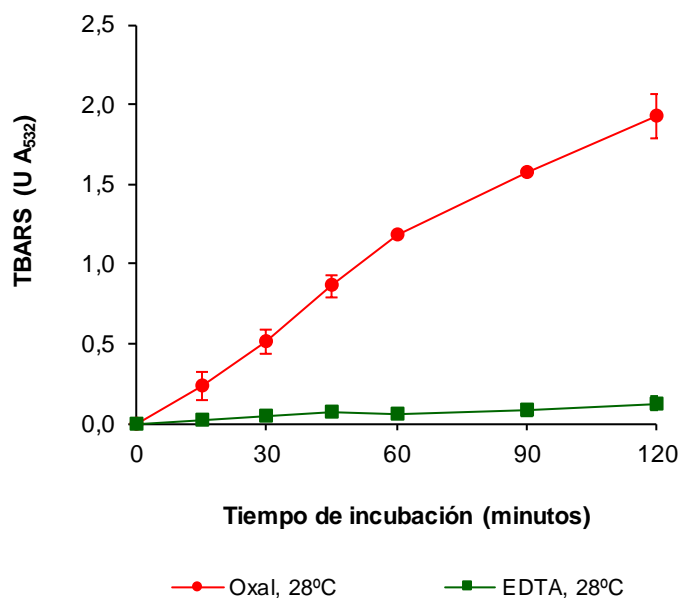
**Figura 3.25.** Evolución del peso seco, concentración de glucosa, pH y QR en cultivos de *A. nidulans* en medio mínimo. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de medio, a 37°C y 180rpm. Los valores mostrados son la media de tres cultivos así como su desviación estándar.

#### 3.1.3.2. Activación del oxígeno por *A. nidulans*

##### 3.1.3.2.1. Producción de TBARS mediante ciclos redox de 2,6-DBQ

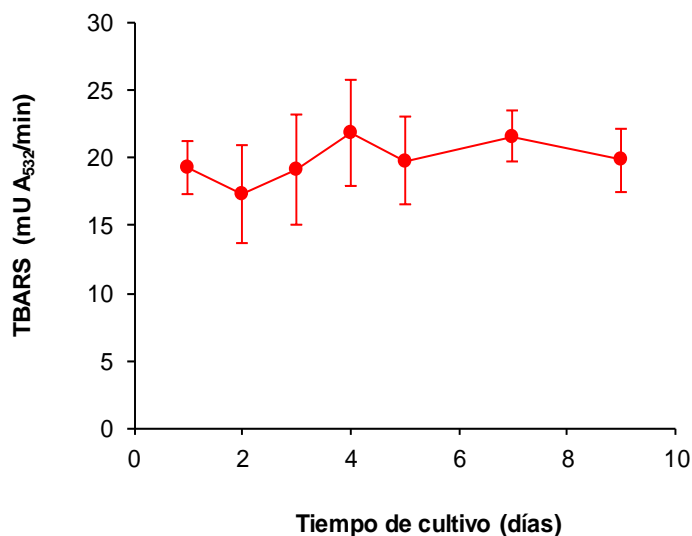
Puesto que *A. nidulans* no produce enzimas que oxiden hidroquinonas, las incubaciones realizadas para demostrar el ciclo redox de la 2,6-DBQ se realizaron a pH 5, empleando el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato como oxidante de la hidroquinona. En paralelo se realizaron incubaciones con  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA como control negativo. La figura 3.26 muestra cómo en las incubaciones con  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato se produjeron TBARS de forma lineal durante los primeros 60 minutos, a una velocidad de  $19,8 \pm 0,1$  mU  $A_{532}$ /min. Por otro lado al emplear EDTA se obtuvieron niveles de producción de TBARS muy bajos, que apenas fueron significativos, con una velocidad inicial de  $0,9 \pm 0,5$  mU

$A_{532}$ /min. Estos resultados demostraban por primera vez la posibilidad de inducir la producción de  $\cdot\text{OH}$  en *A. nidulans*.



**Figura 3.26. Producción de TBARS por *A. nidulans* a 28°C.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$  quelado con ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$  o EDTA 110  $\mu\text{M}$  según los casos y  $2,6 \pm 0,1$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 28°C y 180rpm.

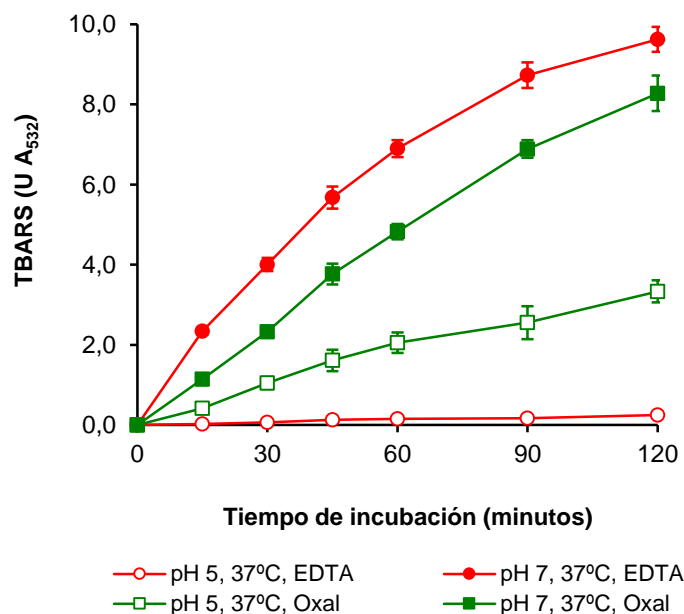
A continuación, se realizó un nuevo experimento para valorar la influencia de la edad del cultivo sobre la producción de TBARS, de forma similar a como se realizó en el caso de la actividad QR. Para ello, micelio obtenido en distintos tiempos de cultivo fue incubado con 2,6-DBQ, 2-desoxirribosa y el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato, obteniéndose los resultados que se representan en la figura 3.27. En ella se observa que no hay diferencias significativas en la producción de TBARS en función de la edad de cultivo. Estos resultados contrastaban con los obtenidos para la QR, que si mostraban diferencias en las muestras tomadas a largo de los distintos tiempos de cultivo. Una posible razón que justifique este hecho podría ser que la reacción limitante del ciclo redox fuera en todo momento la oxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub>, de modo que no las diferencias en la velocidad de reducción de la 2,6-DBQ no influirían sobre la producción de TBARS.



**Figura 3.27. Efecto de la edad de cultivo en la producción de TBARS por *A. nidulans*.** Las incubaciones del hongo a los distintos tiempos de cultivo se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu$ M quelado con ácido oxálico 300  $\mu$ M. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 33ml de mezcla de incubación, a 28°C y 180rpm.

A continuación se realizaron nuevas incubaciones en las que se modificaron varios parámetros con objeto de incrementar la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ . Dichos parámetros fueron la temperatura y el pH, que se hicieron coincidir con los utilizados para cultivar al hongo (37 °C y pH 7). Los resultados del experimento (figura 3.28) muestran como el incremento en la temperatura de las incubaciones en las que se empleó ácido oxálico como quelante, aumentó la velocidad de producción de TBARS hasta un valor de  $35,3 \pm 0,2$  mU  $\text{A}_{532}/\text{min}$  (se recuerda que el valor de velocidad obtenido a 28°C fue  $19,8 \pm 0,1$  mU  $\text{A}_{532}/\text{min}$ ). Aún mayor fue el incremento obtenido en las incubaciones a 37°C, con dicho quelante, al aumentar el pH de reacción a 7,0. En ese caso la velocidad de producción de TBARS fue de  $80,8 \pm 3,9$  mU  $\text{A}_{532}/\text{min}$ . Por lo tanto con la combinación del aumento de temperatura y pH se obtuvo un incremento de casi 4 veces frente a las condiciones de partida.

En las incubaciones con  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA no se observaron una producción de TBARS significativas al aumentar la temperatura a 37°C, tal y como ocurrió en las incubaciones realizadas a 28°C. Sin embargo, las incubaciones realizadas a 37° y pH 7,0 rindieron los mejores resultados de todas las condiciones ensayadas, alcanzándose una velocidad de producción de TBARS de  $122,1 \pm 4,4$  mU  $\text{A}_{532}/\text{min}$ . De estos resultados se deduce, por lo tanto, que si bien el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA no es capaz de oxidar a la 2,6-DBQH<sub>2</sub> a pH 5 si puede hacerlo a pH 7,0.



**Figura 3.28. Efecto del pH y temperatura sobre de TBARS por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 o 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $Fe^{3+}$  100  $\mu$ M quelado con ácido oxálico 300  $\mu$ M o EDTA 110  $\mu$ M según los casos y  $2,3 \pm 0,2$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 28°C o 37°C y 180rpm.

### 3.1.3.2.2. Efecto del pH y del quelante del hierro sobre la oxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub>

Para comprobar que la oxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> era la reacción limitante del ciclo redox para la producción de TBARS, cuando las incubaciones se realizaron con el complejo  $Fe^{3+}$ -oxalato, a pH 5,0 y 28°C (figura 3.27), se llevó a cabo un nuevo experimento en ausencia de 2-desoxirribosa valorando la proporción 2,6-DBQH<sub>2</sub>/2,6-DBQ en cada una de las condiciones ensayadas en el experimento anterior a fin de encontrar una relación entre la producción de TBARS obtenida y dicha proporción. Las concentraciones de 2,6-DBQ y 2,6-DBQH<sub>2</sub> determinadas por HPLC a lo largo de las incubaciones del hongo se encuentran representadas en la figura 3.29.

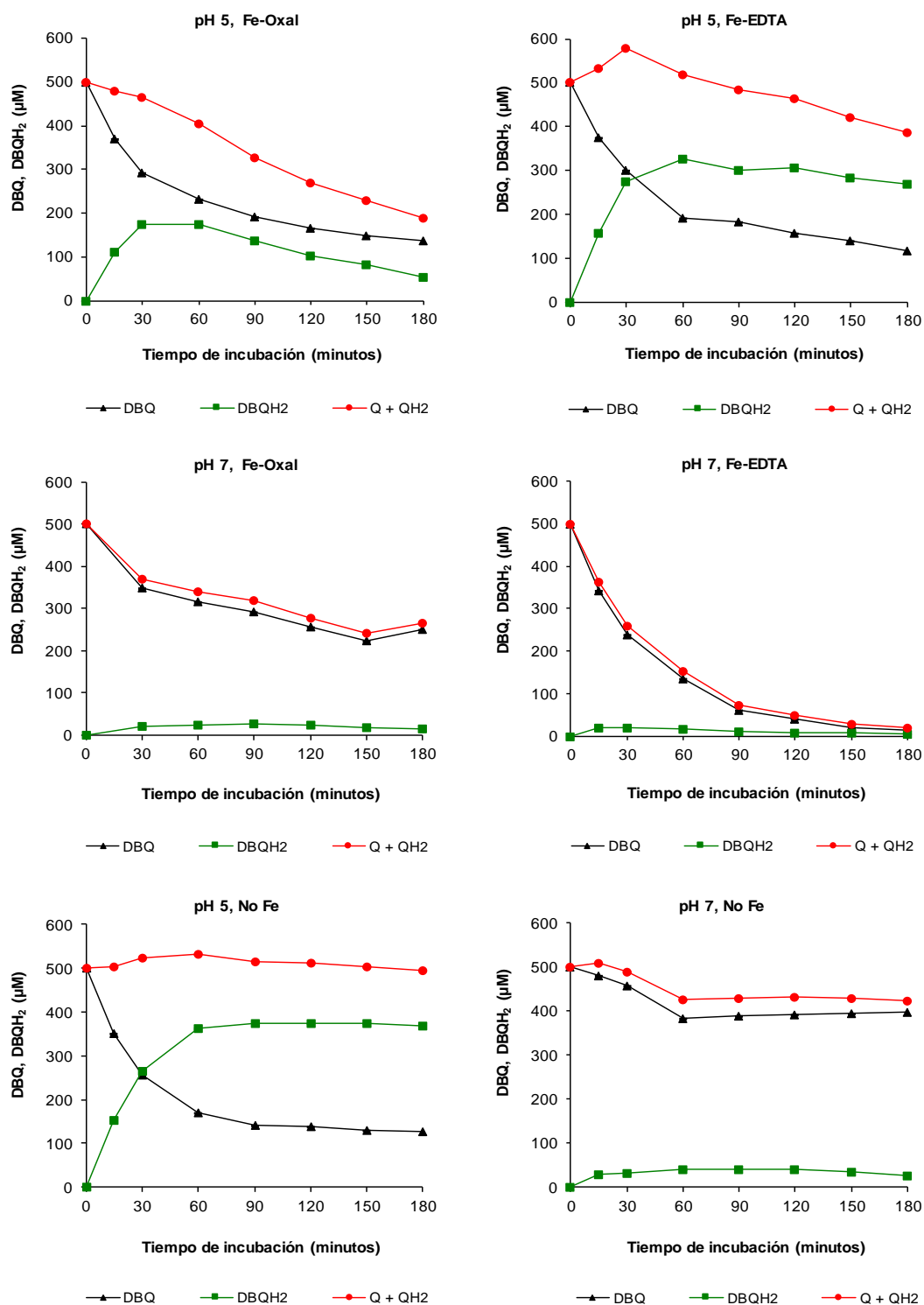


Figura 3.29. Efecto del pH, y quelante del hierro sobre el equilibrio 2,6-DBQ/2,6-DBQH<sub>2</sub>. Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 o 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu\text{M}$  quelado con ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$  o EDTA 110  $\mu\text{M}$  según los casos y 1,5  $\pm$  0,1 mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 28°C o 37°C y 180rpm.

En todas las incubaciones realizadas a pH 5,0 el compuesto predominante fue la 2,6-DBQH<sub>2</sub>, confirmando que la reducción de la 2,6-DBQ no era la reacción limitante del ciclo redox en dichas condiciones. La concentración máxima de 2,6-DBQH<sub>2</sub> alcanzada con Fe<sup>3+</sup>-oxalato fue aproximadamente la mitad a la obtenida en los casos en ausencia de Fe<sup>3+</sup> o con Fe<sup>3+</sup>-EDTA. A pH 7,0, sin embargo, los niveles de 2,6-DBQH<sub>2</sub> presentes en las mezclas de incubación, fueron muy bajos, como consecuencia de la alta velocidad de autooxidación de este compuesto a dicho valor de pH, ya que su concentración fue extremadamente reducida incluso en los controles realizados en ausencia de Fe<sup>3+</sup>. Por otro lado a pH 7,0 y empleando el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA se observó la mayor velocidad de desaparición de 2,6-DBQ(H<sub>2</sub>), en consonancia con los niveles más altos de TBARS obtenidos bajo estas condiciones. Es decir, cuanto mayor es la producción de ·OH más rápida es la degradación de 2,6-DBQ(H<sub>2</sub>).

Para comprobar que el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA es un oxidante eficaz de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> se llevaron a cabo reacciones *in vitro* en las que se valoró la producción de 2,6-DBQ, a fin de calcular la velocidad de oxidación (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3 Oxidación de 2,6-DBQH<sub>2</sub> por distintos complejos de Fe<sup>3+</sup>.** Las reacciones fueron realizadas en tampón fosfato 20 mM con 2,6-DBQH<sub>2</sub> 500 μM y FeCl<sub>3</sub> 100 μM. Aquellas reacciones con EDTA y ácido oxálico contenían dichos compuestos en concentración 110 μM y 300 μM respectivamente. Los valores mostrados son la media de tres reacciones, así como su desviación estándar.

pH	Quinona (μM/min)		
	Fe <sup>3+</sup> -EDTA	Fe <sup>3+</sup> -Oxálico	No Fe <sup>3+</sup>
5	0,0	42,7 ± 1,8	0,0
7	362,3 ± 9,1	128,1 ± 6,2	59,6 ± 3,2

El complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA no fue capaz de oxidar a la 2,6-DBQH<sub>2</sub> a pH 5,0, sin embargo a pH 7,0 dio lugar a la mayor velocidad de oxidación de ésta, siendo casi 3 veces superior a la obtenida con el complejo Fe<sup>3+</sup>-oxalato para el mismo valor de pH, y 6 veces superior a la observada en ausencia de Fe. Por otra parte, el aumento de pH de 5,0 a 7,0 incrementó la velocidad de oxidación de 2,6-DBQH<sub>2</sub> por Fe<sup>3+</sup>-oxalato 3 veces.

### 3.1.3.2.3. Ciclo redox de la 2,6-DBQH<sub>2</sub>

Con objeto de conocer en detalle la parte extracelular del ciclo redox en *A. nidulans* se realizaron una serie de ensayos *in vitro* para determinar las reacciones más relevantes. En primer lugar se estudió la posibilidad de que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> generado en la autooxidación de la semiquinona fuese capaz de oxidar a la 2,6-DBQH<sub>2</sub>, en una reacción de propagación de oxidación de la hidroquinona, tal y como se ha descrito para algunas para algunas naftoquinonas (Öllinger et al., 1990) y recientemente para la 2,5-DBQH<sub>2</sub> (García-Martín, 2017). Para ello se estudió el efecto de la superóxido dismutasa (SOD) sobre la velocidad de autooxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> en reacciones *in vitro*. Los resultados del experimento (Tabla 3.4) mostraron un incremento en la velocidad de autooxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> en las reacciones que contenían SOD de alrededor de 7 y 2,5 veces a pH 6,0 y 7,0 respectivamente. Fenómeno que se explica dado que esta enzima desplaza el equilibrio de autooxidación de la semiquinona al consumir el O<sub>2</sub><sup>-</sup> generado.

De este efecto positivo se puede deducir que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> no propaga la autooxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> a los valores de pH ensayados. Ya que, si así fuera, la velocidad de oxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> tendría que haber sido mayor.



**Tabla 3.4. Efecto de la SOD en la autooxidación de 2,6-DBQH<sub>2</sub>.** Las reacciones fueron realizadas en tampón fosfato 20 mM con 2,6-DBQH<sub>2</sub> 500 μM y, en aquellas reacciones que la contenían, SOD 100U/ml.

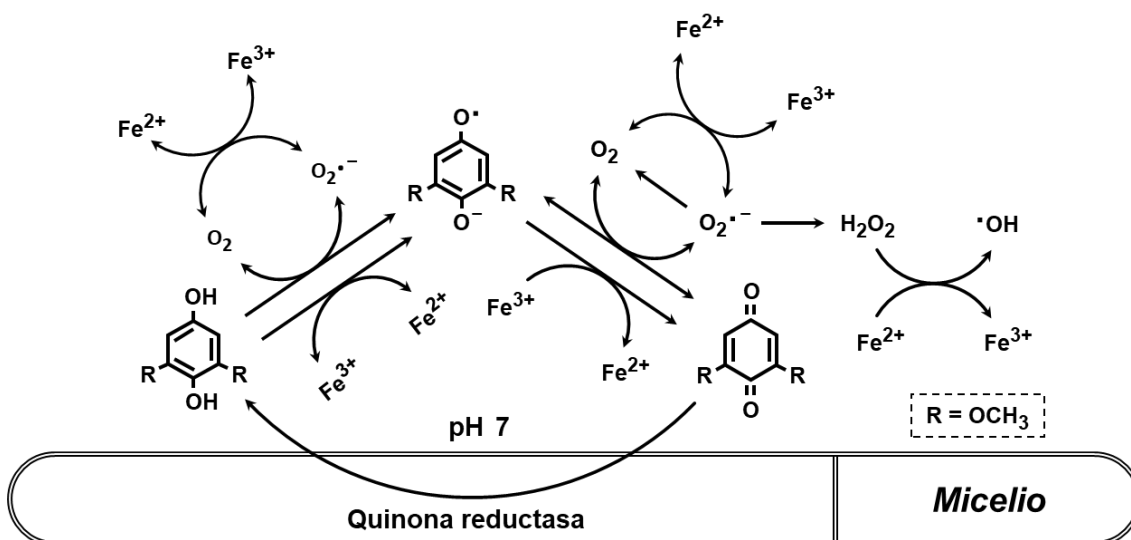
pH	Quinona (μM/min)	
	Sin SOD	Con SOD
6	3,5	25,4
7	64,9	165,6

Por otra parte, con objeto de estudiar si el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA, además de oxidar a la semiquinona, puede oxidar las hidroquinonas a pH 7 se estudió la estequiometría de la reacción. El Fe<sup>2+</sup> se detectó mediante el uso de 1,10-fenantrolina. En todas las reacciones (Tabla 3.5), tanto partiendo de 50 como 100 μM de 2,6-DBQH<sub>2</sub> se obtuvo el doble de Fe<sup>2+</sup> en relación a la concentración inicial de hidroquinona, lo que indica que el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA participa tanto en la oxidación de la hidroquinona como de la semiquinona.

**Tabla 3.5. Reducción de Fe<sup>3+</sup>.** Las reacciones fueron realizadas en tampón fosfato 20 mM pH 7 con 2,6-DBQH<sub>2</sub> 50-100 μM, FeCl<sub>3</sub> 100-200 μM, EDTA 110-220 μM y 1,10- Fenantrolina 1,5mM. Los valores mostrados son la media de tres reacciones, así como su desviación estándar.

DBQH <sub>2</sub> (μM)	Fe <sup>2+</sup>
50	100,4 ± 2,6
100	200,3 ± 4,0

De esta forma quedó resuelta la parte extracelular del ciclo redox de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> en *A. nidulans*, pudiendo representarse de la siguiente forma (figura 3.30).



**Figura 3.30. Esquema del ciclo redox de quinonas a pH 7 en ausencia de enzimas ligninolíticas.**

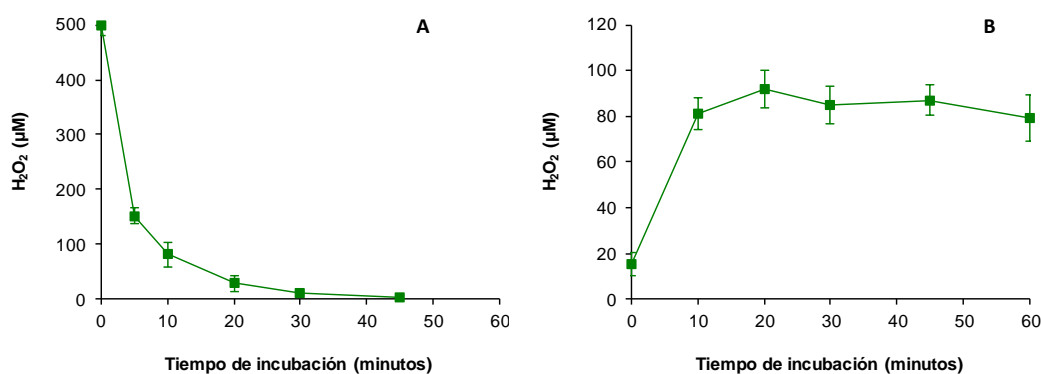
### 3.1.3.3. Determinación de los componentes del reactivo de Fenton.

Pese a que la reacción de Fenton fue descrita en 1894, sigue existiendo una gran controversia en la literatura acerca de si es realmente el radical •OH el oxidante producido (Barbusinski, 2009; Salgado et al., 2013) y/o puede variar en función de las condiciones de reacción. Generalmente se acepta que el oxidante es •OH cuando la reacción de Fenton se realiza con Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 3

(Salgado et al., 2013). Por ello, si bien no era posible determinar con exactitud la naturaleza de los radicales  $\cdot\text{OH}$  por carecer de la metodología necesaria (resonancia de spin electrónico) se decidió confirmar la producción del reactivo de Fenton en las nuevas condiciones de incubación empleadas con *A. nidulans*, es decir, a pH 7,0 y con EDTA como quelante del Fe.

### 3.1.3.3.1. Producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ mediante ciclos redox de 2,6-DBQ.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue el primer componente del reactivo de Fenton cuya producción fue analizada en *A. nidulans*. Para ello se determinó si este hongo también presenta algún sistema de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como los descritos en *P. eryngii* (Gómez-Toribio et al., 2009b) y *G. trabeum* en la presente tesis. Las incubaciones realizadas con este fin contenían micelio lavado de *A. nidulans* y una concentración conocida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que fue monitorizada a lo largo de la incubación (Figura 3.31A). Gracias a este experimento se comprobó que efectivamente dicho sistema existe también en *A. nidulans* y que es capaz de consumir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  con gran rapidez, alcanzándose una velocidad inicial de consumo de  $36,8 \pm 1,1 \mu\text{M}/\text{min}$  por mg de micelio.

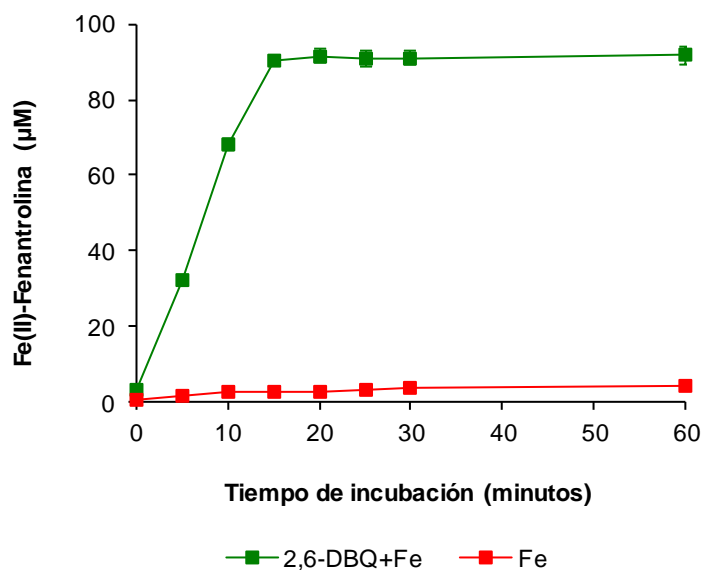


**Figura 3.31. Consumo (A) y producción (B) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en *A. nidulans*.** Las incubaciones destinadas a evaluar el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizaron con  $0,45 \pm 0,1 \text{ mg/ml}$  de micelio, tampón fosfato 20mM, pH 7 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ . Aquellas en las que se evaluó la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizaron con  $2,2 \pm 0,1 \text{ mg/ml}$  de micelio, tampón fosfato 20mM, pH 7 y 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ . En ambos casos se llevaron a cabo a  $37^\circ\text{C}$  y 180rpm.

La producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en *A. nidulans* se estudió en incubaciones de este en presencia de 2,6-DBQ (Figura 3.31B). La velocidad inicial aparente a la que se produjo  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue de  $0,2 \mu\text{M}/\text{min}$  por mg de micelio hasta alcanzarse el equilibrio con el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , manteniéndose constante una concentración cercana a  $80 \mu\text{M}$  a partir de ese momento.

### 3.1.3.3.2. Reducción de $\text{Fe}^{3+}$ mediante el ciclo redox de la 2,6-DBQ.

A continuación se estudió la formación del segundo componente del reactivo de Fenton,  $\text{Fe}^{2+}$ , por reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA. Para ello se realizó una nueva incubación del hongo en presencia de 2,6-DBQ, el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA y 1,10-. Los resultados del experimento (figura 3.32) mostraron la rápida reducción de todo el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en la mezcla de incubación en aproximadamente 15 minutos, con una velocidad de  $0,19 \mu\text{M}/\text{minuto}$  por mg de micelio.



**Figura 3.32. Reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron con  $1,16 \pm 0,1$  mg/ml de micelio, tampón fosfato 20mM, pH 7 y 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{FeCl}_3$  100 $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  y 1,10-Fenantrolina 1,5 mM a 37°C y 180rpm. Los valores mostrados son la media de tres incubaciones así como su desviación estándar

#### 3.1.3.3.3. Hidroxilación de ácido 4-hidroxibenzoico.

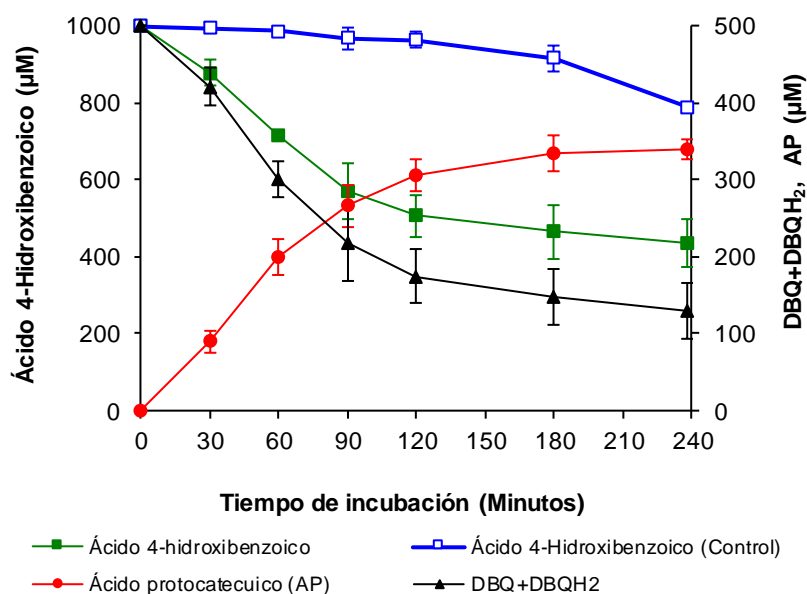
Una vez comprobada la producción del reactivo de Fenton se determinó si el oxidante generado era capaz de, además de producir TBARS a partir de 2-desoxirribosa, hidroxilar compuestos aromáticos. El diseño experimental para comprobarlo consistió en incubaciones del hongo a pH 7,0, con 2,6-DBQ,  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA y ácido 4-hidroxibenzoico, cuyo producto de oxidación (ácido protocatecuico) se detectó mediante HPLC (figura 3.33).

En dicho ensayo se observó una velocidad inicial de producción de ácido protocatecuico, calculada a partir de los primeros 60 minutos de reacción, de  $3,3 \pm 0,4$   $\mu\text{M}/\text{min}$ , alcanzándose una concentración de este compuesto de  $339,8 \pm 13,6$   $\mu\text{M}$  al final del experimento. Este resultado confirma por lo tanto la capacidad del oxidante generado para hidroxilar compuestos aromáticos.

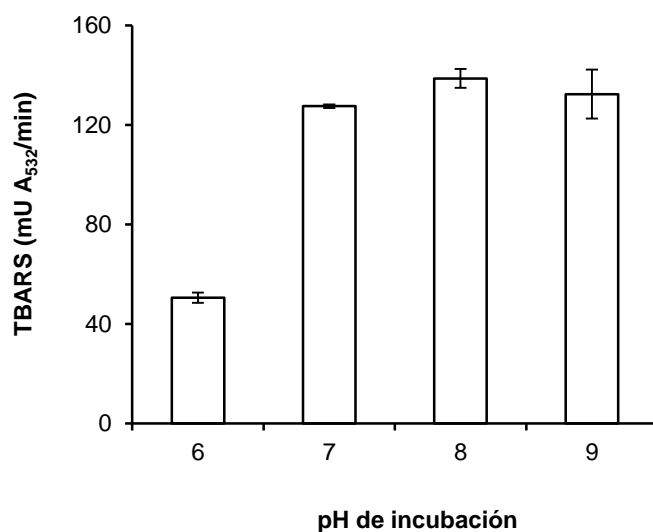
#### 3.1.3.4. **Determinación de las condiciones óptimas de producción de radicales $\cdot\text{OH}$**

##### 3.1.3.4.1. Efecto del pH y la temperatura

Puesto que los mejores resultados de producción de radical  $\cdot\text{OH}$  se obtuvieron con  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA a pH 7,0, se decidió continuar los estudios con este complejo y explorar si nuevos cambios en el pH podían incrementar más la producción de  $\cdot\text{OH}$ . Para ello se realizó un nuevo experimento en el que se valoró la producción de TBARS en incubaciones del hongo en el rango de pH 6-9. En dicho ensayo se obtuvo nuevamente producción lineal de TBARS durante los primeros 60 minutos de incubación, a partir de los cuales se calcularon las velocidades de producción de estas sustancias, las cuales están representadas en la figura 3.34.



**Figura 3.33. Formación de ácido protocatecuico por hidroxilación de ácido 4-hidroxi benzoico en incubaciones de *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, ácido 4-hidroxi benzoico 1mM,  $Fe^{3+}$  100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M y  $1,8 \pm 0,3$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a  $37^{\circ}C$  y 180rpm.



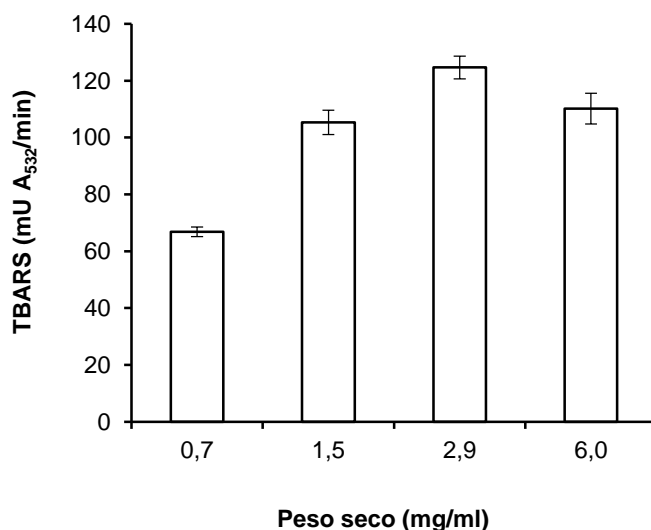
**Figura 3.34. Efecto del pH en la producción de TBARS por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 6-9 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $Fe^{3+}$  100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M y  $2,7 \pm 0,5$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a a  $37^{\circ}C$  y 180rpm.

Al pasar de pH 6,0 a 7,0 se produjo un gran incremento en la velocidad de producción de TBARS y el valor de velocidad alcanzado no varió significativamente a pH 8 y 9. Este resultado indica que probablemente a valores de pH 7,0 o superiores se alcanza la velocidad máxima del ciclo redox de la 2,6-DBQ permitida por la actividad reductasa presente, dado que valores superiores de pH, que facilitarían aún más la oxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> no se traducen en un incremento de velocidad de producción de TBARS.

### 3.1.3.4.2. Determinación de la concentración óptima de micelio

Si como se ha sugerido en el párrafo anterior a valores altos de pH la reacción que limita la velocidad del ciclo redox es la reducción de la 2,6-DBQ, intentar incrementar más la velocidad implicaría aumentar los niveles de QR, lo que se podría conseguir aumentando la cantidad de micelio. Por ello se realizó un experimento valorando como influye la cantidad de micelio en la producción de  $\cdot\text{OH}$ . En dicho experimento se emplearon diluciones de micelio 1/4 y 1/2 de la concentración presente en los cultivos, la cual se había empleado hasta ahora, así como el doble de esta.

La figura 3.35 muestra como la velocidad de producción de TBARS incrementó al aumentar la concentración de micelio hasta valores que correspondían con la concentración de los cultivos, pero no más allá de ese punto. Este fenómeno posiblemente se deba a una limitación por parte del sustrato, en este caso 2,6-DBQ, y en cierta medida a un mayor secuestro de  $\cdot\text{OH}$  por una cantidad excesiva de micelio presente en las mezclas de incubación. En base a estos resultados se continuó el estudio con la misma concentración de micelio presente en los cultivos.



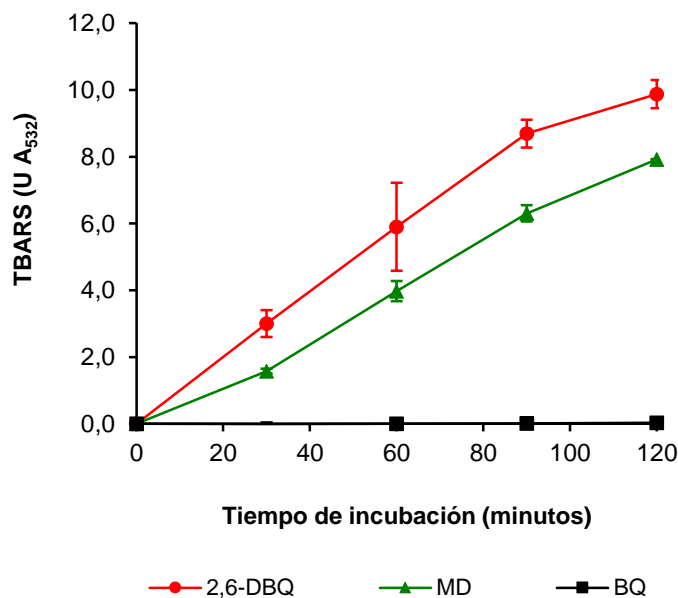
**Figura 3.35. Efecto de la cantidad de micelio en la producción de TBARS por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  y distintas cantidades de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm.

### 3.1.3.4.3. Selección de quinona y concentración óptima de la misma

Las quinona reductasas descritas en varios hongos se caracterizan por presentar una baja especificidad de sustrato por el dador electrónico (Brock et al., 1995; Lee et al., 2007). Por esta razón se valoró la posibilidad de que otras quinonas pudieran sustentar el ciclo redox en *A. nidulans*. Las quinonas seleccionadas fueron la 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona; MD) y 1,4-benzoquinona (BQ), con las que previamente se había demostrado el establecimiento de ciclos redox en *P. eryngii* (Guillén et al., 1997). A efectos comparativos la 2,6-DBQ también fue incluida en el estudio.

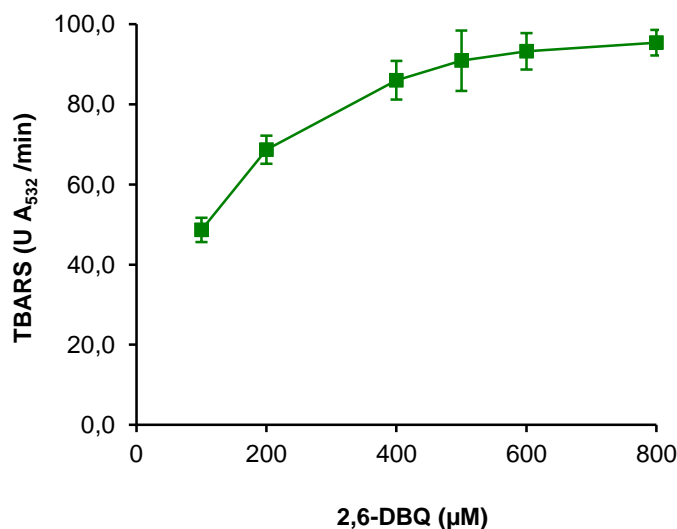
En el experimento realizado, cuyos resultados se muestran en la figura 3.36, se observó producción de TBARS tanto con MD como con la 2,6-DBQ, de manera lineal a lo largo de los 120 minutos, pero no así con la BQ, cuya hidroquinona es la más difícil de oxidar, por lo que

probablemente el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA no fuera capaz de oxidarla. La producción de TBARS con MD fue inferior a la observada con 2,6-DBQ, por lo que se decidió continuar empleando 2,6-DBQ.



**Figura 3.36. Producción de TBARS por *A. nidulans* en función de la quinona empleada.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían cada una de las quinonas 500  $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  y  $2,5 \pm 0,1$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a 37°C y 180rpm.

Para calcular la concentración óptima de 2,6-DBQ se prepararon incubaciones del hongo con concentraciones de esta comprendidas entre 100 y 800  $\mu\text{M}$  y, tras comprobar que en todos los casos la producción de TBARS era lineal, se calcularon velocidades iniciales utilizando los datos obtenidos en los primeros 60 minutos de reacción. La representación de esas velocidades frente a la concentración de DBQ empleada se muestra en la figura 3.37. Se obtuvo una hipérbola rectangular en la cual conforme aumenta la concentración de DBQ la producción de TBARS deja de ser proporcional a dicha concentración para acercarse asintóticamente a un valor máximo que refleja que el sistema está saturado por el sustrato. Dado que en este sistema la única encima que participa es la QR, la cinética observada probablemente se deba a la actividad de esta enzima.

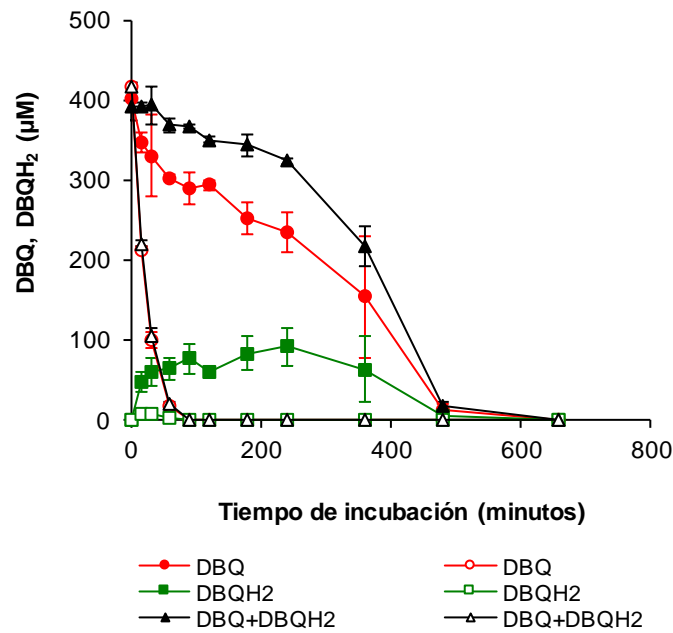


**Figura 3.37. Efecto de la concentración de 2,6-DBQ en la producción de TBARS por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían concentraciones de 2,6-DBQ en el rango de 100-800 μM, 2-desoxirribosa 2,8 mM, Fe<sup>3+</sup> 100 μM, EDTA 110 μM y 2,3 ± 0,1 mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm.

De estos resultados se deduce que una concentración 400 μM de DBQ es la mínima necesaria para alcanzar velocidad de producción de TBARS máxima.

#### 3.1.3.4.4. Velocidad de degradación de la 2,6-DBQ

Un importante factor a tener en cuenta en la aplicación del mecanismo de producción de ·OH estudiado en la degradación de contaminantes es la es la velocidad de degradación de las quinonas que participan en el ciclo. Esta degradación se había observado en experimentos previos (figura 3.29), si bien los tiempos de los ensayos fueron cortos, por lo que se realizó un nuevo experimento que abarcara tiempos de incubación mayores. En los ensayos realizados el hongo mostró la capacidad de degradar 2,6-DBQ, aun en ausencia de producción de radicales ·OH (figura 3.38), hecho que no se había observado previamente. Los casos que contenían el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA, y en los que por tanto se indujo la producción de radicales ·OH, mostraron una rápida velocidad de desaparición de la 2,6-DBQ (10,4 μM/min) durante los primeros 30 minutos de incubación, que condujo a la desaparición total del compuesto tras 90 minutos de reacción.



**Figura 3.38. Consumo de 2,6-DBQ por *A. nidulans* en presencia y ausencia de inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$ .** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 400  $\mu\text{M}$  y  $1,9 \pm 0,1$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm. Las series con símbolos vacíos contenían además  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  y EDTA 110  $\mu\text{M}$  para inducir la producción de  $\cdot\text{OH}$ .

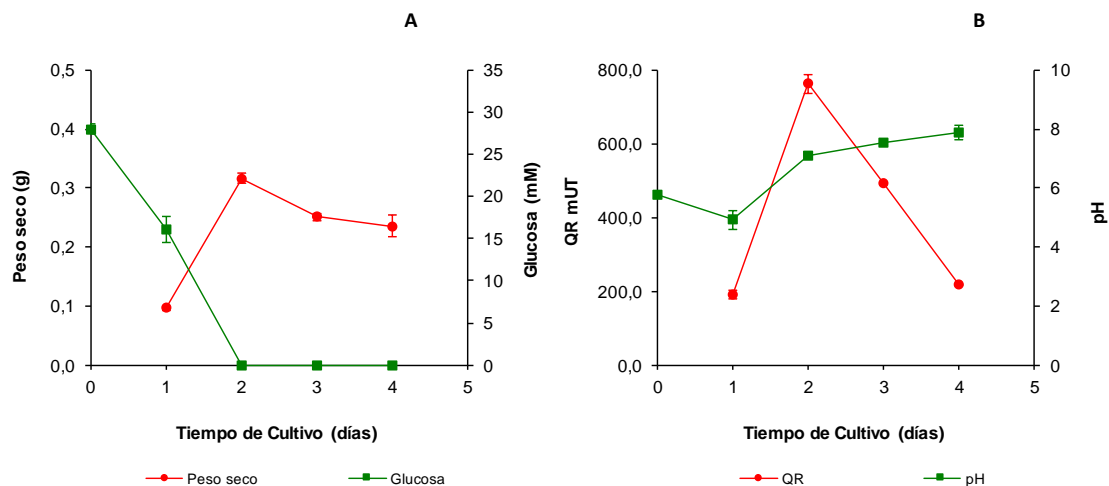


### 3.1.4. *Penicillium oxalicum*

#### 3.1.4.1. Determinación de las condiciones de cultivo para la producción de radicales hidroxilo.

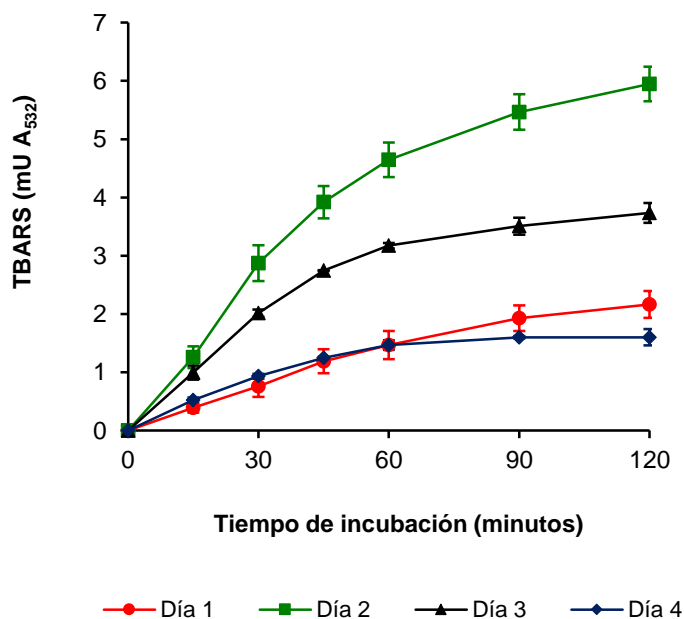
El cultivo de *P. oxalicum* se llevó a cabo en medio Czapeck Dox suplementado con extracto de levadura y peptona que contenía 5g/l de glucosa como fuente de carbono, a 28 °C y 120 rpm, empleando como inóculo 20 µl de una suspensión de esporas. En esas condiciones pudo observarse como el hongo alcanza el peso máximo el segundo día (figura 3.39), coincidiendo con el agotamiento de la glucosa del medio, para descender al tercer y cuarto día paulatinamente. El pH del medio sufrió un leve descenso el primer día para, a continuación, aumentar hasta un valor de  $7,1 \pm 0,1$  el segundo día. A partir de ese momento se observa un ligero incremento, alcanzándose un valor final de pH de  $7,9 \pm 0,1$ .

En los cultivos se buscaron actividades enzimáticas que pudiesen estar implicadas en ciclos redox de quinonas, sin embargo, tal y como ocurrió con *A. nidulans* sólo se detectó actividad QR, que fue determinada valorando la reducción de 1,4-BQ (figura 3.39). De igual manera que para el peso del hongo, el máximo de actividad de esta enzima ( $762,0 \pm 26,9$  mUT) se dio el segundo día de cultivo.



**Figura 3.39.** Evolución del peso seco y concentración de glucosa (A), y del pH y actividad QR (B) en cultivos de *P. oxalicum* en Medio Czapeck Dox suplementado con extracto de levadura y peptona y que contenía 5 g/l de glucosa. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio, a 28°C y 120rpm.

Una vez comprobada la producción de QR, que pudiera estar implicada un ciclo redox de quinonas, se estudió la capacidad de *P. oxalicum* para producir radicales  $\cdot\text{OH}$ . Dicha capacidad se evaluó en los distintos días de cultivo en las condiciones óptimas de *A. nidulans*: incubaciones a pH 7,0 y uso del complejo EDTA como quelante del hierro. Los resultados de este experimento (figura 3.40) mostraron un comportamiento muy similar al observado para la actividad QR, obteniéndose la máxima producción de TBARS el segundo día de cultivo con una velocidad de  $89,2 \pm 4,5$  mU  $A_{532}/\text{min}$ , calculada a partir de los 45 primeros minutos de incubación. De forma similar los niveles más bajos de producción de TBARS se dieron el primer y cuarto día de cultivo con velocidades de  $26,3 \pm 4,0$  mU  $A_{532}/\text{min}$  y  $27,7 \pm 1,0$  mU  $A_{532}/\text{min}$  respectivamente, coincidiendo con la menor actividad QR, quedando patente una vez más el papel fundamental de dicha enzima para la inducción de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ .



**Figura 3.40. Efecto de la edad del cultivo en la producción de TBARS por *P. oxalicum*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM,  $Fe^{3+}$  100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M según los casos y una dilución 1:2 del micelio obtenido en el cultivo. Estas se llevaron a cabo a 28°C y 120 rpm.

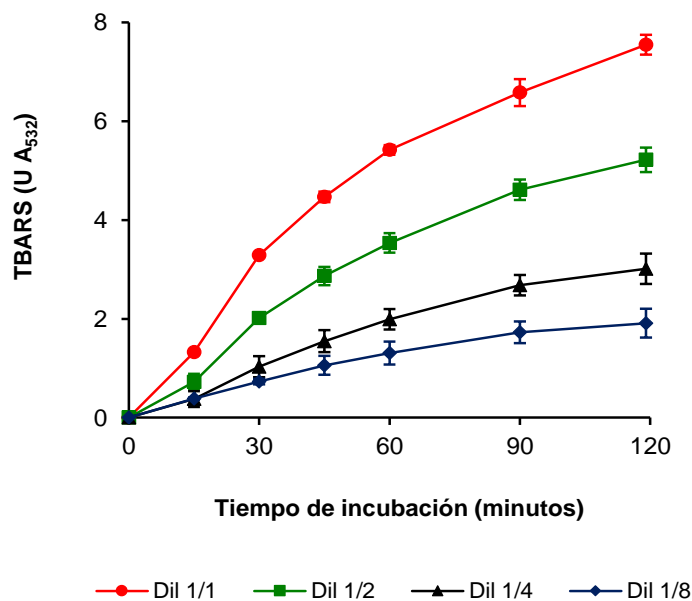
### 3.1.4.2. Influencia de la biomasa sobre la producción de radicales hidroxilo.

Puesto que los mejores resultados de producción de  $\cdot OH$  se obtuvieron con micelio de 2 días, se decidió continuar el resto de experimentos con dicho micelio, estudiando a continuación la cantidad de este que resultaría óptima para la producción de TBARS. Para ello se valoró la producción de TBARS obtenida en incubaciones de distintas proporciones del hongo respecto al cultivo.

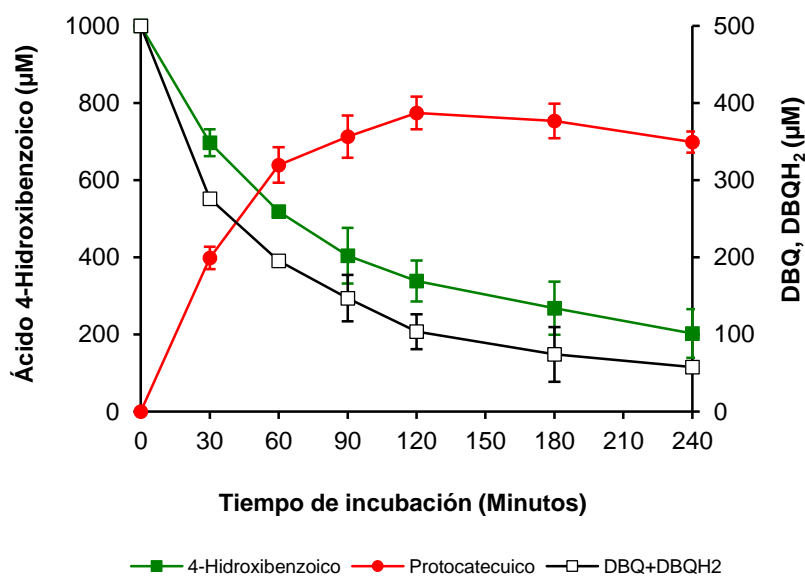
Se comprobó que la producción de TBARS era proporcional a la cantidad de micelio en todo el intervalo de condiciones ensayadas (figura 3.41). La mayor velocidad de producción de TBARS se obtuvo empleando la misma proporción de micelio que la presente en los cultivos del hongo ( $102,4 \pm 1,6$  mU  $A_{532}/min$ ), indicando que la reducción de la 2,6-DBQ es la velocidad que limita la velocidad de producción de  $\cdot OH$ .

### 3.1.4.3. Hidroxilación de ácido 4-Hidroxibenzoico por *P. oxalicum*

La producción de  $\cdot OH$  en *P. oxalicum* se evaluó también estimando la hidroxilación del ácido 4-hidroxibenzoico. En los resultados de la figura 3.42 se puede apreciar como el ácido 4-hidroxibenzoico se transformó en ácido protocatecuico durante las dos primeras horas de incubación. A partir de ese punto se observó un ligero descenso en la concentración de ácido protocatecuico, posiblemente debido a que su velocidad de desaparición por acción de los radicales  $\cdot OH$  supera a la de su formación al haberse reducido la concentración de ácido 4-hidroxibenzoico.



**Figura 3.41. Efecto de la cantidad de micelio en la producción de TBARS por *P. oxalicum*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM, Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M según los casos y distintas cantidades de micelio de 2 días en proporción a la cantidad presente en los cultivos. Las incubaciones se llevaron a cabo a 28°C y 120 rpm.

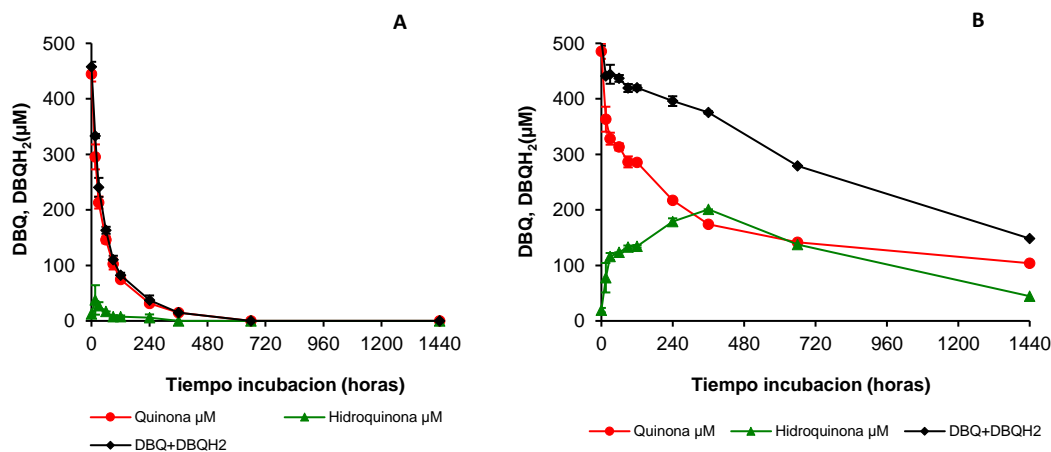


**Figura 3.42. Hidroxilación de ácido 4-hidroxibenzoico por *P. oxalicum*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM, Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M y 1,99  $\pm$  0,04 mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 28°C y 120 rpm.

### 3.1.4.4. Consumo de 2,6-DBQ por *P. oxalicum*

Un factor limitante en la producción de  $\cdot\text{OH}$  durante largos periodos de tiempo es la degradación de la quinona cuyo ciclo redox conduce a la producción de dichos radicales. Además, en *A. nidulans* se comprobó que el hongo posee la capacidad para degradar este compuesto, por lo que se decidió comprobar si *P. oxalicum* ocurría algo similar.

Los resultados de la figura 3.43 muestra un rápido descenso de la concentración de 2,6-DBQ( $\text{H}_2$ ) en las incubaciones en las que se indujo la producción de  $\cdot\text{OH}$ , agotándose dicho compuesto tras 6 horas de incubación. En las incubaciones en ausencia del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA, y por tanto en ausencia de radicales  $\cdot\text{OH}$ , se observó también la desaparición de la 2,6-DBQ( $\text{H}_2$ ), si bien a un ritmo mucho menor, alcanzándose una concentración cercana a 150  $\mu\text{M}$  tras 24 horas de incubación. Además la ausencia del complejo de hierro, redujo la velocidad de oxidación de la 2,6-DBQH<sub>2</sub> generada por el hongo, permitiendo que esta se acumule hasta una concentración máxima de 201,2  $\mu\text{M}$ .

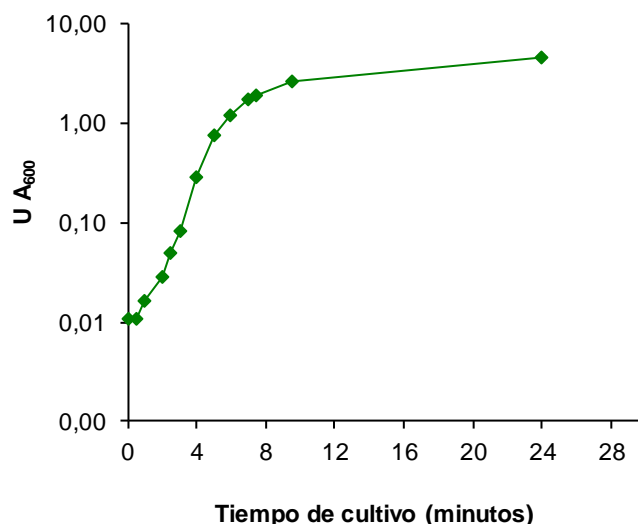


**Figura 3.43. Consumo de DBQ por *P. oxalicum* en condiciones de inducción de  $\cdot\text{OH}$  (A) y sin inducir (B).** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $1,7 \pm 0,1$  mg/ml de micelio y  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ -EDTA 110  $\mu\text{M}$  en condiciones de inducción de  $\cdot\text{OH}$  (A). Estas incubaciones se llevaron a cabo a 28°C y 120 rpm.

### 3.1.5. *Pseudomonas putida*

#### 3.1.5.1. Cultivo de *P. putida*

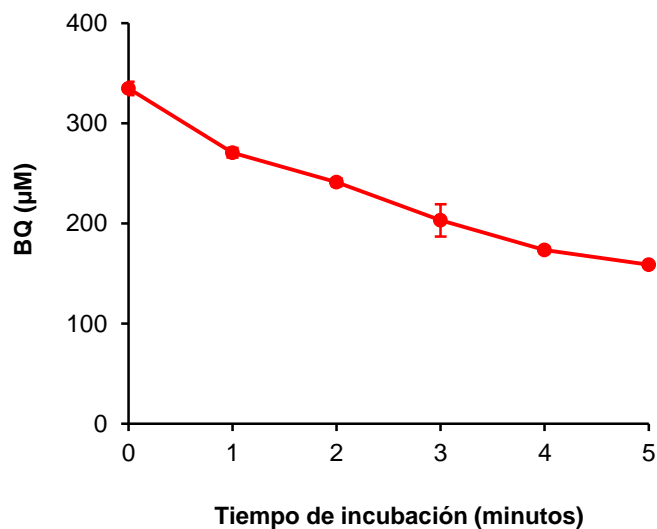
El cultivo de *P. putida* se llevó a cabo en caldo LB, realizándose en dicho medio una curva de crecimiento mediante medida de turbidez (Figura 3.44) que permitió discernir una fase de latencia de aproximadamente de 2h, de crecimiento exponencial hasta la quinta hora de cultivo y finalmente el comienzo de la fase estacionaria a partir de ese momento. No se observó fase de muerte en los tiempos ensayados.



**Figura 3.44. Curva de crecimiento de *P. putida* en medio de cultivo LB.** Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de medio, a 28 °C y 180 rpm, empleando como inóculo 100 µl de un cultivo 16h realizado en las mismas condiciones. Los valores mostrados son la media de tres cultivos así como su desviación típica.

#### 3.1.5.2. Actividad quinona reductasa en *P. putida*

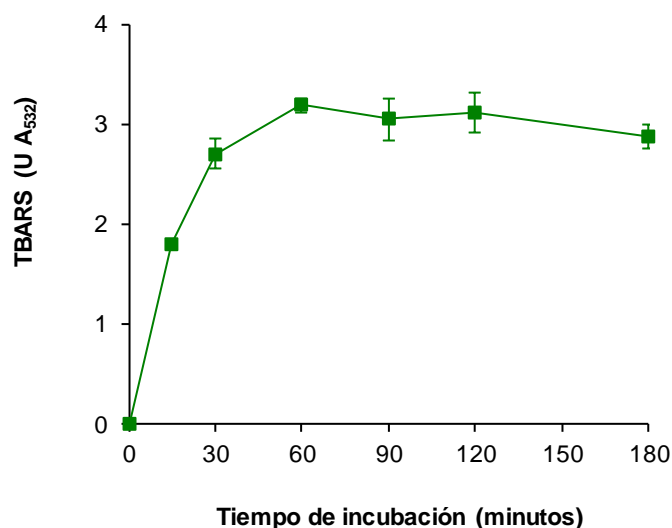
Como ha sido demostrado con los hongos ascomicetos objeto de estudio, el requisito básico para poder producir radicales  $\cdot\text{OH}$  a partir de un ciclo redox de quinonas es que el microorganismo produzca una enzima con actividad QR y que sus productos de reducción se secreten al medio extracelular. La producción de QR por *P. putida* se comprobó en incubaciones de la bacteria con BQ (Figura 3.45), en las cuales se alcanzó una velocidad de reducción de la misma de  $131,9 \pm 2,8 \mu\text{M}/\text{min}$ , tras considerar las diluciones del cultivo realizadas en cada caso.



**Figura 3.45. Reducción de BQ por *P. putida*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato pH 7 20 mM, BQ 400 µM y la concentración de bacterias presentes en un cultivo de 16 h. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 20ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

### 3.1.5.3. Producción de radicales ·OH en *P. putida*

La producción de radicales ·OH en *P. putida* se comprobó mediante análisis de producción de TBARS en incubaciones de ésta a pH 7,0 y empleando EDTA como quelante del hierro. En tales condiciones se observó producción de TBARS, a una velocidad de  $89,9 \pm 5,0$  mU  $A_{532}$ /min, si bien ésta solo ocurrió durante los primeros 30 minutos de incubación, tal y como se muestra en la figura 3.46. Estos resultados demuestran por primera vez la posibilidad de inducir en bacterias no filamentosas un ciclo redox de quinonas que conduzca a la producción de radicales ·OH, de forma similar a como se había demostrado previamente en hongos.

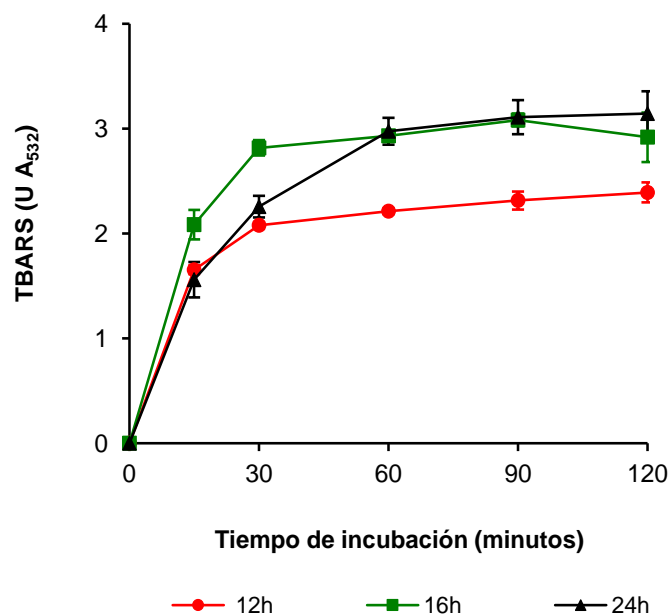


**Figura 3.46. Producción de TBARS por *P. putida*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500 µM,  $FeCl_3$  100 µM, EDTA 110µM, 2-desoxirribosa 2,8 mM y la concentración de bacterias correspondiente a un cultivo de 16h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm.

### 3.1.5.3.1. Influencia de la edad del cultivo sobre el ciclo redox de quinonas en *P. putida*.

Una vez confirmada la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en este organismo se procedió a evaluar la influencia de diferentes factores sobre esta. El primer factor a tener en cuenta fue la edad de cultivo, por lo que se realizaron estudios enfocados a comprobar el establecimiento del ciclo en las distintas fases de crecimiento de la bacteria y tiempos de cultivo.

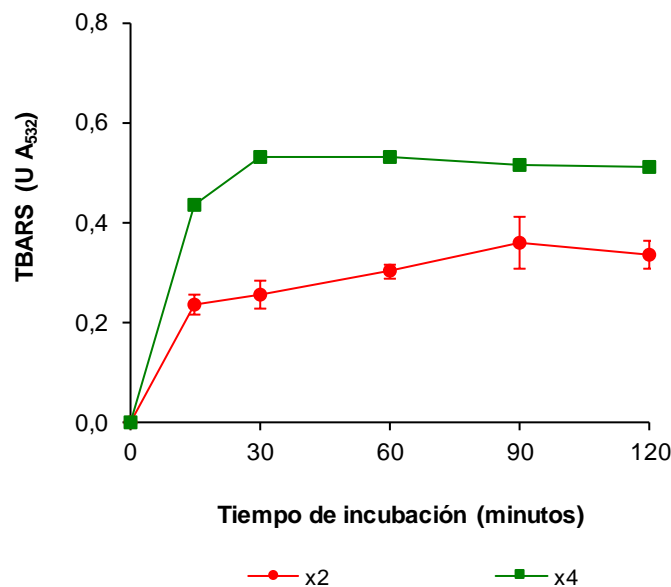
En primer lugar, a fin de profundizar en el conocimiento de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  durante la fase estacionaria de crecimiento, se realizó un ensayo de producción de TBARS con cultivos de 12, 16 y 24 h. Los resultados, que se presentan en la figura 3.47, no mostraron grandes diferencias entre los distintos tiempos de cultivo. La mayor velocidad inicial, calculada hasta los primeros 15 minutos de incubación, se obtuvo con el cultivo de 16 h y fue de  $139,0 \pm 2,0$  mU  $A_{532}$ /min. Las obtenidas para los cultivos de 12 y 24 h fueron similares con valores de  $110 \pm 0,9$  y  $104,0 \pm 2,3$  mU  $A_{532}$ /min respectivamente. Si bien la principal diferencia se observó en la duración de la producción de TBARS, puesto que ésta se detuvo antes en los cultivos de 12 h. La explicación a estos resultados podría ser que exista una mayor expresión de quinona reductasa durante la fase estacionaria, y que esta todavía no se haya alcanzado los máximos niveles en los cultivos de 12 h. En cuanto a las diferencias entre los cultivos de 16 y 24 h probablemente se deban a la presencia de un menor número de células viables en las 24 h debido a su mayor edad.



**Figura 3.47. Efecto de la edad de cultivo sobre la producción de TBARS por *P. putida*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110 $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM y la concentración de bacterias correspondiente a cultivos de 12, 16 y 24h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm.

A continuación se valoró la posibilidad de inducir la producción de  $\cdot\text{OH}$  durante la fase de crecimiento exponencial. Para ello se empleó un cultivo de 5 h, el cual se concentró 2 y 4 veces debido a la escasa biomasa producida en ese tiempo. Los resultados obtenidos, figura 3.48, demostraban que durante la fase exponencial también se puede inducir la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ . Las velocidades de producción fueron notablemente inferiores a las obtenidas con células de fase estacionaria, como era de esperar debido a la menor biomasa presente.

Concretamente se obtuvieron velocidades de  $15,6 \pm 0,4$  y  $28,9 \pm 0,2$  mU  $A_{532}$ /min en incubaciones realizadas con células 2 y 4 veces concentradas.

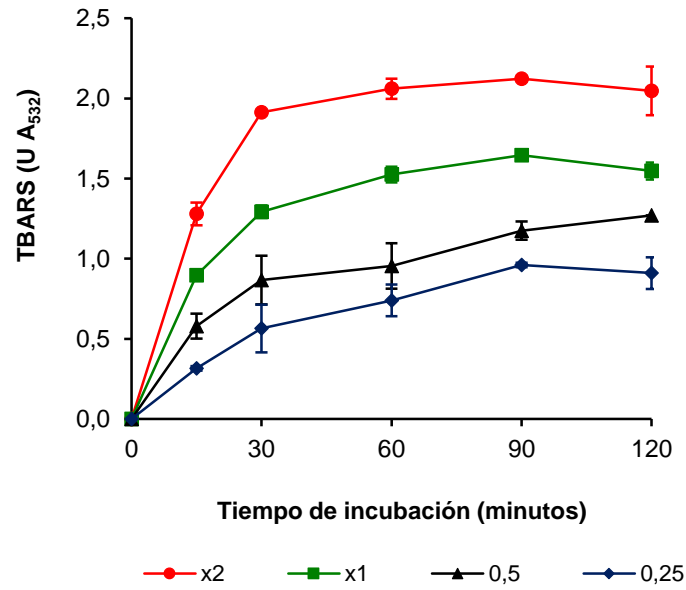


**Figura 3.48. Producción de TBARS por *P. putida* durante la fase exponencial de crecimiento.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu$ M,  $FeCl_3$  100  $\mu$ M, EDTA 110 $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM y la concentración de bacterias correspondiente a cultivos de 5h en 40 ml de caldo LB concentrada 2 o 4 veces. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm.

### 3.1.5.3.2. Efecto de la biomasa en la producción de radicales $\cdot OH$ .

Con objeto de determinar la concentración más adecuada de células en fase estacionaria de *P. putida* para producir los mayores niveles de  $\cdot OH$  se realizó un ensayo con diferentes proporciones de bacteria respecto a la del cultivo. En dicho experimento (figura 3.49) se observó que existía una correlación positiva entre el número de células presentes y la producción de TBARS en todo el rango de concentraciones ensayado, lo que indica que en ese rango la reacción limitante del ciclo redox es la reducción de 2,6-DBQ a 2,6-DBQH<sub>2</sub>.



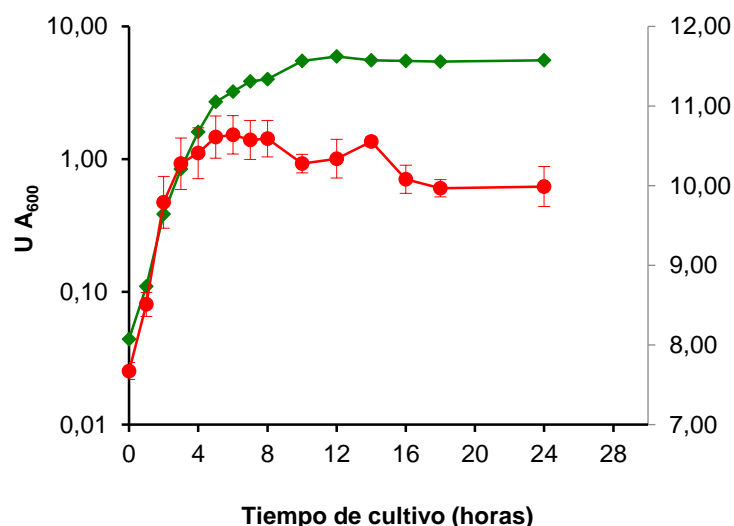


**Figura 3.49. Efecto de la cantidad de biomasa sobre la producción de TBARS por *P. putida*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, EDTA 110 $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM y diferentes proporciones de bacterias respecto a la concentración correspondiente a un cultivo de 16h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm. Los valores mostrados son la media de tres incubaciones así como su desviación típica.

### 3.1.6. *Escherichia coli*

#### 3.1.6.1. Cultivo de *E. coli*

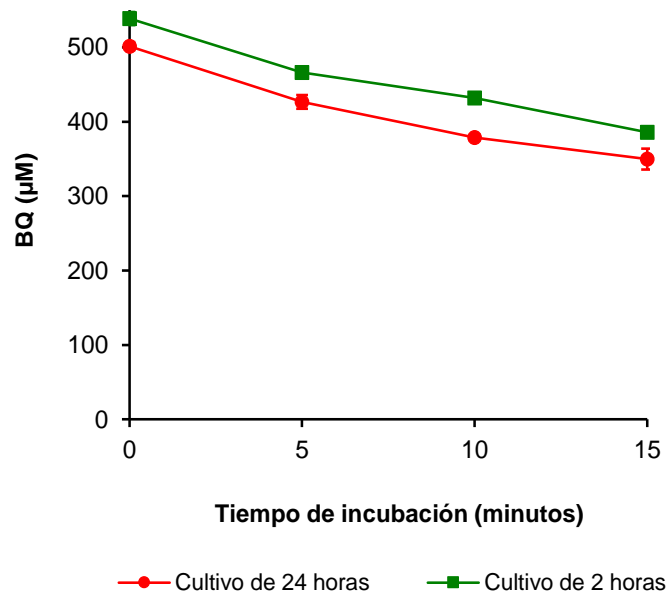
Para cultivar a *E. coli* también se empleó el caldo LB. La curva de crecimiento de la bacteria en este medio se realizó determinando la turbidez y realizando recuentos de células viables tras realizar diluciones decimales sucesivas de los cultivos. Las curvas obtenidas por ambos procedimientos (Figura 3.50) muestran las fases de latencia, crecimiento exponencial y estacionaria, no llegándose a alcanzar la fase de muerte en el tiempo ensayado.



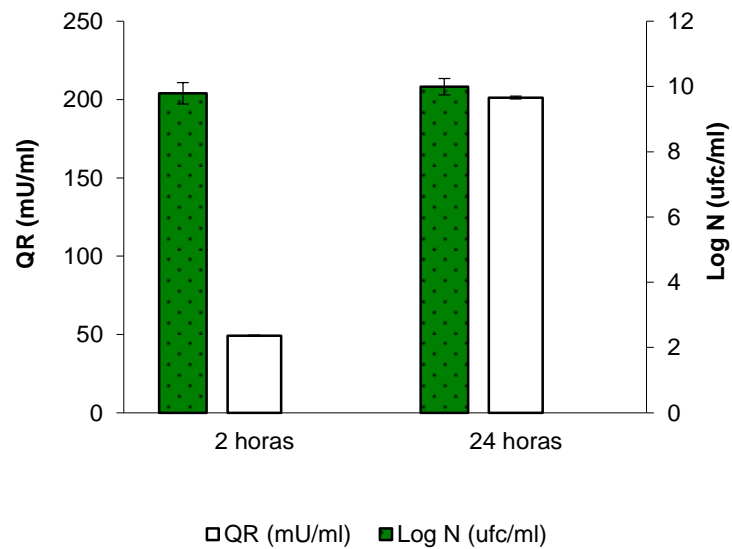
**Figura 3.50. Curva de crecimiento de *E. coli* en medio de cultivo LB.** Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de medio, a 37 °C y 180 rpm, empleando como inóculo 400 µl de un cultivo 12h realizado en las mismas condiciones.

#### 3.1.6.2. Actividad quinona reductasa en *E. coli*

Para comprobar si *E. coli* expresa alguna actividad QR en las condiciones de cultivo empleadas, se llevaron a cabo incubaciones de la bacteria con BQ, en las que se valoró la conversión de ésta a BQH<sub>2</sub>. En *P. putida* se observó una gran diferencia en la producción de TBARS entre cultivos que habían alcanzado la fase estacionaria y los que se encontraban en fase exponencial (apartado 3.1.5.3.1), la cual no pudo ser referida a diferencias entre la biomasa presente o niveles de actividad QR por ausencia de dichos datos. Por esta razón, con *E. coli* se llevó a cabo el ensayo con células del final de la fase exponencial y de la fase estacionaria, a fin de comprobar si las fases tenían algún efecto sobre la expresión de la QR. Los resultados obtenidos, ilustrados en la figura 3.51, muestran la detección de actividad QR tanto con células en fase exponencial como con las que se encontraban en fase estacionaria. Sin embargo, dicha actividad fue 4 veces mayor con la células del cultivo en fase estacionaria, concretamente  $201,3 \pm 0,9$  mU/ml frente a las  $49,2 \pm 0,4$  mU/ml obtenidas con células del cultivo en fase exponencial. Los recuentos de células viables en ambas fases de crecimiento mostraron a su vez que dicha diferencia no se debía a variaciones en el número de células, puesto que no se encontraron diferencias significativas entre ambos cultivos para dicho parámetro (figura 3.52). Por lo tanto es probable que exista un aumento de la expresión de la actividad QR en *E.coli* durante la fase estacionaria de crecimiento.



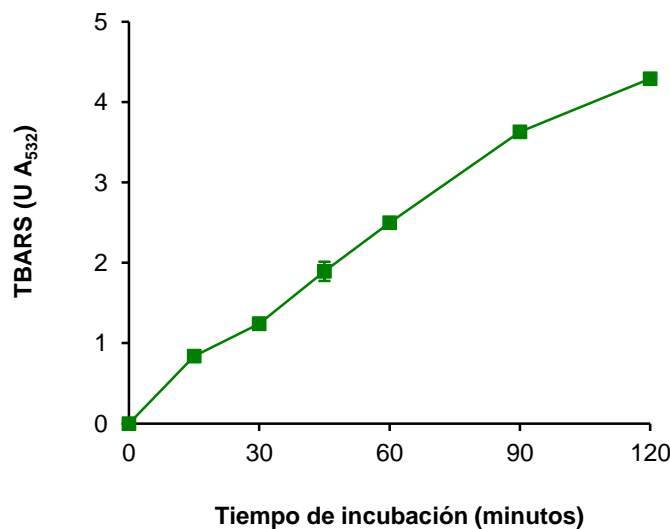
**Figura 3.51. Reducción de BQ por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato pH 7 20 mM, BQ 500 µM y bacterias obtenidas de cultivos en fase exponencial (2h) y estacionaria (24h) diluidas apropiadamente. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 20ml de mezcla de incubación a 37°C y 180rpm



**Figura 3.52. Actividad QR y número de viables en cultivos de *E. coli* en fase exponencial y estacionaria.** La actividad QR se calculó a partir de los datos representados en la figura 3.52. Se muestra también el número de viables presentes en ambos cultivos.

### 3.1.6.3. Producción de radicales $\cdot\text{OH}$ en *E. coli*

Para comprobar que se pudiese inducir la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en *E. coli* se realizaron incubaciones de células de un cultivo de 12 h, es decir en fase estacionaria, en la que se había comprobado que existía mayor actividad QR, a pH 7 y empleando EDTA como quelante del hierro. Los resultados del experimento (figura 3.53) demostraron, como en *P. putida*, que se puede inducir la producción de  $\cdot\text{OH}$  extracelular en bacterias unicelulares. La velocidad de producción de TBARS fue de  $39,6 \pm 0,2$  mU<sub>532</sub>/min, calculada a partir de los primeros 90 minutos de incubación.

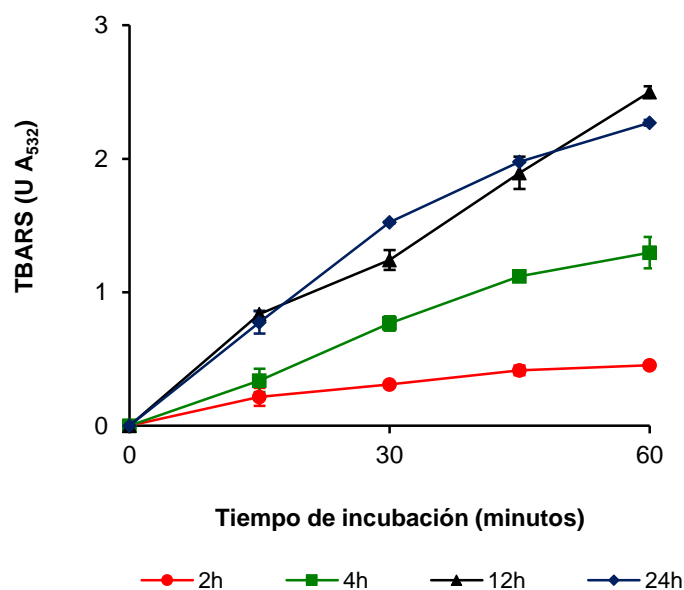


**Figura 3.53. Producción de TBARS por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110 $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM y la concentración de bacterias correspondiente a un cultivo de 12h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37°C y 180rpm.

#### 3.1.6.3.1. Influencia de la edad del cultivo sobre la producción de $\cdot\text{OH}$ en *E. coli*

Puesto que los ensayos de valoración de QR habían mostrado grandes diferencias entre las distintas edades de cultivo, se decidió comprobar si éstas se reflejarían en la producción de TBARS por la bacteria. Para ello se estudio la producción de TBARS de cultivos de 2, 4, 12 y 24h, realizando en paralelo recuentos de células viables con el fin de determinar el efecto de este parametro sobre la producción de  $\cdot\text{OH}$ .

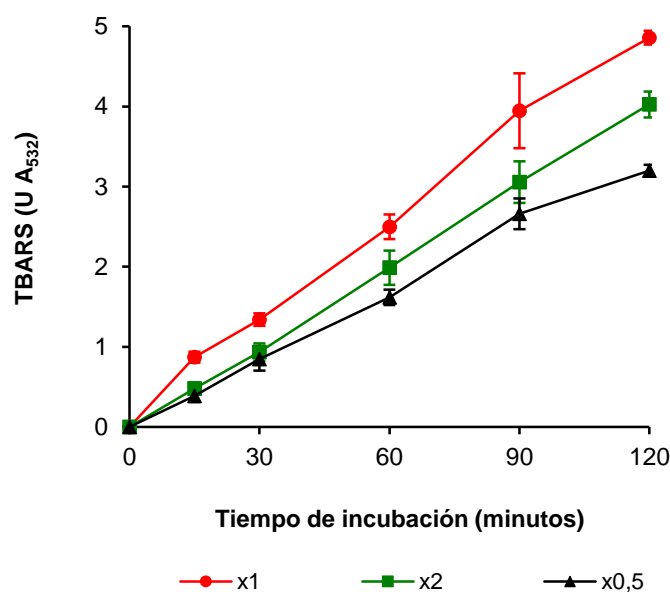
La producción de TBARS fue lineal en todos los casos durante los 60 minutos de incubación, independientemente de la edad de las células (figura 3.54). Los niveles de producción de TBARS si que variaron entre las distintas condiciones, obteniéndose valores de velocidad de  $4,4 \pm 1,0$ ,  $25,2 \pm 0,9$ ,  $40,6 \pm 1,2$  y  $44,6 \pm 0,6$  mU A<sub>532</sub>/min a las 2, 4, 12 y 24 h respectivamente, lo que indica que la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  aumenta inicialmente con la edad de las células hasta un máximo en el que se mantiene, al menos en el intervalo de tiempos de cultivo ensayados, ya que apenas se observaron diferencias entre los cultivos de 12 y 24 h.



**Figura 3,54. Efecto de la edad de cultivo sobre la producción de TBARS por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, EDTA 110 $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM y la concentración de bacterias correspondiente a cultivos de 2, 4, 12 y 24h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37 °C y 180rpm.

### 3.1.6.3.2. Efecto de la biomasa en la producción de radicales $\cdot$ OH

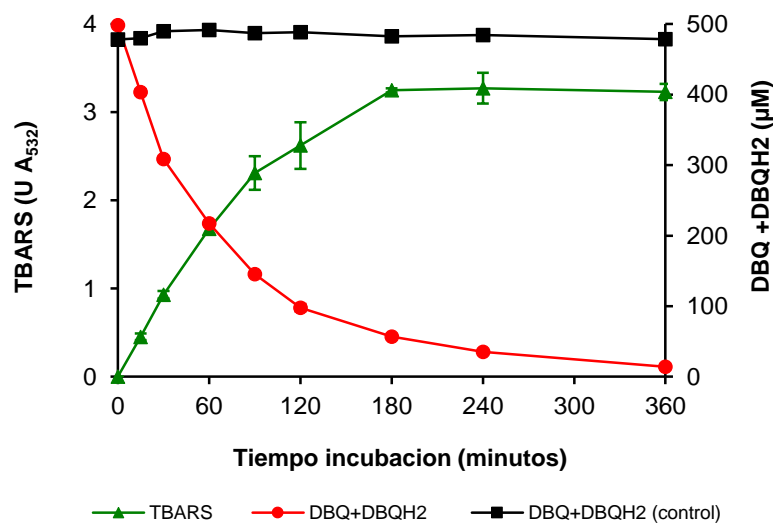
Junto a la edad de las células, determinada previamente, es importante controlar la cantidad de biomasa con la que se realizan las incubaciones destinadas a la producción de radicales  $\cdot$ OH, especialmente en este caso, debido a la ausencia de experiencias previas con bacterias que sirvan de orientación. Por lo tanto, para determinar la influencia de este parámetro sobre la producción de radicales  $\cdot$ OH se realizaron incubaciones de *E. coli* con proporciones 1:1, 2:1 y 1:2 de células respecto a las presentes en el cultivo de procedencia. Los resultados mostraron la menor producción de TBARS en el caso de la proporción 1:2 (figura 3.55) con una velocidad, calculada a partir de los primeros 60 minutos de incubación, de  $27,5 \pm 1,1$  mU A<sub>532</sub>/min. Al aumentar la concentración de células hasta la que se encontraba en los cultivos también aumentó la producción de TBARS, hasta alcanzar una velocidad de  $40,4 \pm 1,3$  mU A<sub>532</sub>/min. Sin embargo, al duplicar la concentración de células no se obtuvo un nuevo aumento en la velocidad de producción de TBARS, sino que descendió a  $33,9 \pm 1,1$  mU A<sub>532</sub>/min, dejando patente el efecto negativo que supone un exceso de biomasa en la mezcla de incubación. Estos resultados podrían explicar además la mayor producción de TBARS en las incubaciones con cultivos de mayor edad, donde el número de células es superior.



**Figura 3.55. Efecto de la cantidad de biomasa sobre la producción de TBARS por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, EDTA 110 $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM y diferentes proporciones de bacterias respecto a la concentración correspondiente a un cultivo de 12h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37°C y 180rpm.

#### 3.1.6.3.3. Degradación de 2,6-DBQ

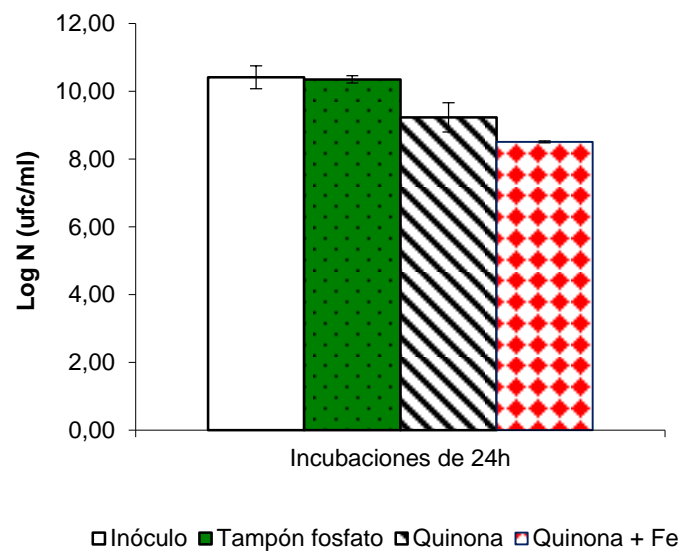
Durante la inducción de radicales  $\cdot$ OH mediante ciclos redox de quinonas se produce la degradación de dichas quinonas por acción de los radicales  $\cdot$ OH y, en ocasiones, porque el microorganismo presenta la capacidad para metabolizarlas, como se comprobó en *A. nidulans* (apartado 3.1.3.4.4). Por ello, tras comprobar la posibilidad de inducir  $\cdot$ OH en *E. coli* mediante el ciclo redox de la 2,6-DBQ, se evaluaron ambas posibilidades. En las incubaciones que contenían Fe<sup>3+</sup>-EDTA, y en las que por lo tanto se inducía la producción de  $\cdot$ OH, se observó el descenso rápido de la 2,6-DBQ de forma paralela a la generación de TBARS (figura 3.56). A medida que la concentración de 2,6-DBQ continua disminuyendo también lo hace la velocidad de producción de TBARS, hasta que finalmente ésta se detiene. En los controles, realizados en ausencia de Fe<sup>3+</sup>-EDTA, no se apreciaron cambios en la concentración de DBQ, lo que indica que en el periodo de 6 h del experimento *E. coli* no fue capaz de degradarla, a diferencia de lo observado para algunos de los hongos con los que se realizaron experimentos similares.



**Figura 3.56. Degradación de DBQ por *E. coli* en condiciones de inducción de  $\cdot\text{OH}$  y sin inducir la producción.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110 $\mu\text{M}$ , 2-desoxirribosa 2,8 mM y la concentración de bacterias correspondiente a un cultivo de 12h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37°C y 180rpm. Los controles carecían del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA.

#### 3.1.6.3.4. Efecto de la producción de $\cdot\text{OH}$ sobre la viabilidad de *E. coli*

Finalmente se estudió el efecto que los  $\cdot\text{OH}$ , así como los compuestos implicados en su producción podrían tener sobre la viabilidad del cultivo. Para ello la bacteria fue incubada en tampón fosfato a pH 7 durante 24h con 2,6-DBQ, en ausencia y presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA, llevándose a su vez incubaciones control en tampón fosfato. Tras 24h se realizaron recuentos de células viables para estimar el número de bacterias presentes en cada uno de las condiciones (figura 3.57). Los resultados del experimento pusieron de manifiesto cierta toxicidad por parte de la 2,6-DBQ, ya que mostraron una pérdida de parte de la población en su presencia. El efecto pernicioso observado fue ligeramente superior en condiciones de producción de  $\cdot\text{OH}$ , en las que el número de viables se redujo aproximadamente en dos órdenes de magnitud respecto al control.



**Figura 3.57. Efecto de la producción de  $\cdot\text{OH}$  sobre la viabilidad de *E. coli*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20mM pH 7, y contenían según se indique 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$  (Quinona) y  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ -EDTA 110 $\mu\text{M}$  (Fe). La concentración de bacterias empleada fue correspondiente a un cultivo de 12h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37°C y 180rpm.



### 3.2. POTENCIAL DEGRADATIVO DE *C. RIGIDA*

El estudio del potencial degradativo de *C. rigida* consistió en la determinación de la capacidad oxidativa de la lacasa que produce, de la optimización y aplicación del sistema lacasa-mediador tanto *in vitro* como *in vivo* y finalmente el desarrollo de estrategias de biooxidación avanzada.

#### 3.2.1. Lacasa *in vitro*

A fin de evaluar el potencial degradativo de la lacasa de *C. rigida* y posteriormente de los sistemas lacasa-mediador, tanto *in vitro* como *in vivo*, se seleccionaron como compuestos a degradar colorantes textiles. Los ensayos de eliminación de colorantes textiles por hongos productores de lacasas son habituales puesto que son una alternativa respetuosa con el medioambiente para el tratamiento de estos contaminantes y, además, permiten valorar la amplitud de su capacidad degradativa, debido al elevado número de colorantes existentes y la variabilidad estructural que presentan. En el caso de *C. rigida* se ha comprobado la capacidad del hongo para degradar varios colorantes de tipo antraquinona en ensayos *in vivo* (Sanchez-Lopez et al., 2008).

El número de compuestos seleccionados fue de 27, pertenecientes a 7 grupos estructurales diferentes (antraquinona, azo, diazo, triarilmetano, heterociclo, ftalocianina e índigo. El porcentaje de decoloración de estos compuestos tras 1 y 24 horas de reacción se muestra en la tabla 3.6. Además de estos resultados, la tabla contiene el tipo estructural al que pertenece cada colorante y las longitudes de onda utilizadas para estimar su pérdida de color (García-Martín, 2017).

Los cuatro colorantes de tipo antraquinona utilizados fueron oxidados por la lacasa de manera eficaz, alcanzado porcentajes de decoloración superiores al 80% tras una hora de reacción con Acid Blue 45, Acid Green 25 y Reactive Blue 19. Estudios del grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo sobre la biodegradación de colorantes, en los que se complementa el análisis de decoloración de las muestras con la determinación de la concentración de los compuestos por HPLC, han revelado la existencia de absorbancia residual a la longitud de onda utilizada con cada colorante cuando éstos han sido completamente degradados (García-Martín, 2017; Moya et al., 2010).

Los colorantes con un solo grupo azo (N=N) constituyen el grupo más numeroso de compuestos analizados. En este caso, dos de los colorantes no fueron oxidados por la lacasa, a saber: Acid Yellow 17 y Tartrazine. Los mejores resultados se consiguieron con Crocein Orange G, Acid Red 88, Methyl Orange, New Coccine y Orange II, los cuales presentaron porcentajes de decoloración comprendidos entre el 30 y 50% tras una hora de reacción y superiores al 80% a las 24 horas. Los porcentajes de decoloración más bajos se obtuvieron con el Chromotrope 2R y el Tropaeolin O. En cuanto a los cinco colorantes diazo ensayados, es de destacar que todos fueron oxidados. Las mayores tasas de decoloración tras 1 hora se obtuvieron con Acid Black 24 y Acid Blue 113, las cuales se mantuvieron constantes hasta el final de las reacciones. Este hecho podría explicarse de dos maneras: primero, si los compuestos han sido completamente degradados, se podría deber a la absorción de luz de intermediarios y productos de reacción a las longitudes de onda utilizadas; y segundo, debido a una inhibición de la enzima por dichos productos, antes de que se complete la oxidación de los colorantes. La actividad de la lacasa sobre los tres colorantes diazo restantes fue muy inferior, no llegando a alcanzar el 10% de decoloración tras una hora de reacción.

Los cinco compuestos de tipo triarilmetano fueron de igual modo oxidados en mayor o menor grado por la enzima. La mayor actividad se observó con Bromophenol Blue y Cresol Red, seguidos por Methyl Blue y Brilliant Green, ocupando el último lugar el Crystal Violet.

**Tabla 3.6. Degradación de colorantes por la lacasa de *C. rigida*.** Las reacciones se realizaron en tampón acetato 20 mM, pH 5, con 300 mU/ml de lacasa y 50  $\mu$ M de cada uno de los colorantes. Se muestra el tipo de colorante, la longitud de onda empleada en la evaluación de su decoloración y el porcentaje de decoloración obtenido tras 1 y 24 horas de reacción.

Colorante	Tipo	$\lambda$ (nm)	% de decoloración	
			1h	24h
Acid Black 48	Antraquinona	657	35	72
Acid Blue 45	Antraquinona	593	81	96
Acid Green 25	Antraquinona	608	92	94
Reactive Blue 19	Antraquinona	592	94	98
Acid Red 88	Azo	502	47	98
Acid Yellow 17	Azo	402	0	0
Chromotrope 2R	Azo	505	4	56
Crocein Orange G	Azo	480	50	95
Methyl Orange	Azo	457	41	83
New Coccine	Azo	506	36	97
Orange II	Azo	485	31	97
Tartrazine	Azo	427	0	0
Tropaeolin O	Azo	388	18	60
Acid Black 24	Diazo	566	67	73
Acid Blue 113	Diazo	549	71	79
Acid Orange 63	Diazo	418	6	21
Ponceau SS	Diazo	513	3	67
Reactive Black 5	Diazo	596	0	21
Brilliant Green	Triarilmetano	624	13	96
Bromophenol Blue	Triarilmetano	590	79	99
Cresol red	Triarilmetano	434	67	72
Crystal Violet	Triarilmetano	588	7	44
Methyl Blue	Triarilmetano	601	16	89
Azure B	Heterociclo	645	0	0
Neutral Red	Heterociclo	530	0	3
Fe(III) phthalocyanine	Ftalocianina	631	82	97
Indigo carmine	Indigo	609	66	99

Los últimos colorantes ensayados fueron de tipo heterociclo, ftalocianina, e índigo. La velocidad de oxidación de estos compuestos por la lacasa sólo fue alta en los dos últimos casos. Los porcentajes de decoloración obtenidos con los dos heterociclos no llegaron a alcanzar el 10% tras una hora de reacción.

Como resumen de estos resultados es de destacar que de los 27 colorantes ensayados solamente cuatro no fueron oxidados por la enzima. De los 23 compuestos restantes, el porcentaje de decoloración a las 24 horas de 20 de ellos superó el 50% y, entre éstos, 11 alcanzaron el 90%.

Este ensayo *in vitro*, llevado a cabo con la lacasa de *C. rigida* empleó los mismos colorantes que el ensayo realizado por García-Martín (2017) para la lacasa de *P. eryngii* y condiciones de reacción similares, por lo que resulta idóneo para una comparación entre ambas lacasas. De los cuatro colorantes de tipo antraquinona ensayados, el porcentaje de decoloración fue mayor con la lacasa de *C. rigida*, resultando especialmente relevante este hecho para el Reactive Blue 19, que fue decolorado en más de un 90% con la lacasa de *C. rigida* tras 1 h de reacción mientras que fueron necesarias 3 h con la lacasa de *P. eryngii* para alcanzar un 25%. Los colorantes tipo azo, que resultaron especialmente recalcitrantes para la lacasa de *P. eryngii* con porcentajes de decoloración inferiores en todos los casos al 10% tras 3 h de reacción, presentaron porcentajes de decoloración entre 18 y 50% a la hora empleando la lacasa de *C. rigida*, con la excepción del Cromotrope 2R, Tartrazine y Acid Yellow, permaneciendo estos dos últimos inalterados en las reacciones con ambas lacasas. En el caso de los colorantes de tipo diazo y triarilmetano también se observó una mayor degradación por parte de la lacasa de *C. rigida*, que además resulto efectiva con 3 colorantes sobre los que no pudo actuar la lacasa de *P. eryngii*. El colorante de tipo índigo estudiado también mostró un mayor potencial oxidativo de la lacasa de *C. rigida*, puesto que fue decolorado en un 99% por esta en 24h, siendo dicho porcentaje del 11% para el mismo periodo de tiempo al emplear la lacasa de *P. eryngii*. La única excepción a la mayor capacidad degradativa que presenta la lacasa *C. rigida* la encontramos en el caso del colorante tipo heterociclo Azure B, que no fue decolorado por ésta pero si por la de *P. eryngii*. Estos resultados muestran por tanto el enorme potencial degradativo que presenta la lacasa de *C. rigida* y concuerdan con resultados que habían mostrado la acción de esta enzima sobre rojo fenol (Saparrat et al., 2002), que presenta un alto potencial redox y no suele ser sustrato de las lacasas. En este sentido, cabe mencionar que un estudio reciente ha revelado que sólo la lacasa de *C. rigida* junto a otras lacasas de alto potencial redox, como las producidas por *Trametes villosa* y *Pycnoporus coccineus*, son capaces de oxidar directamente tintas de serigrafía recalcitrantes (Fillat et al., 2012).

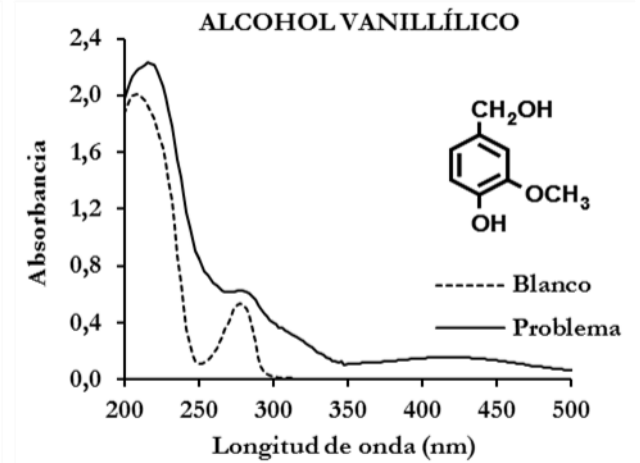
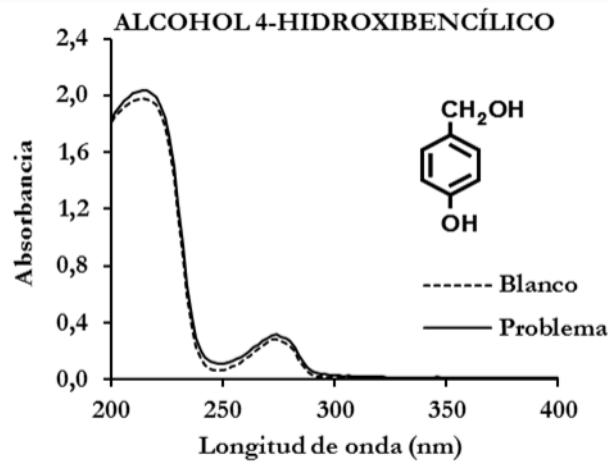
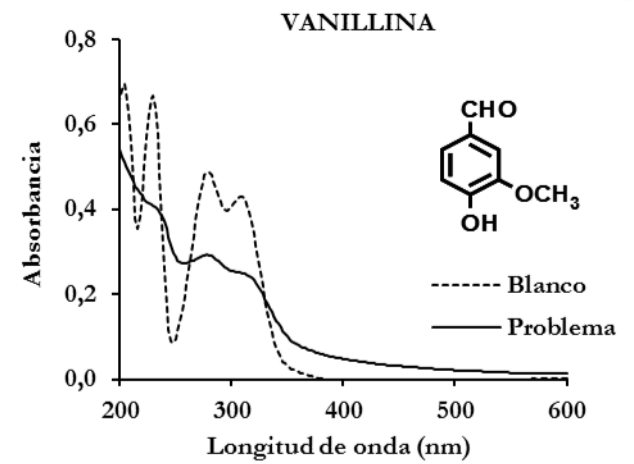
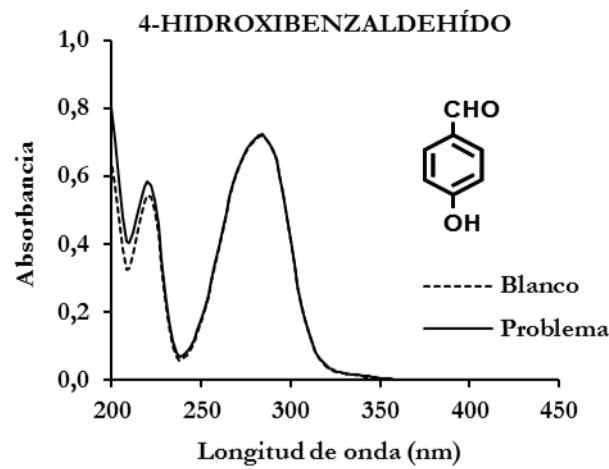
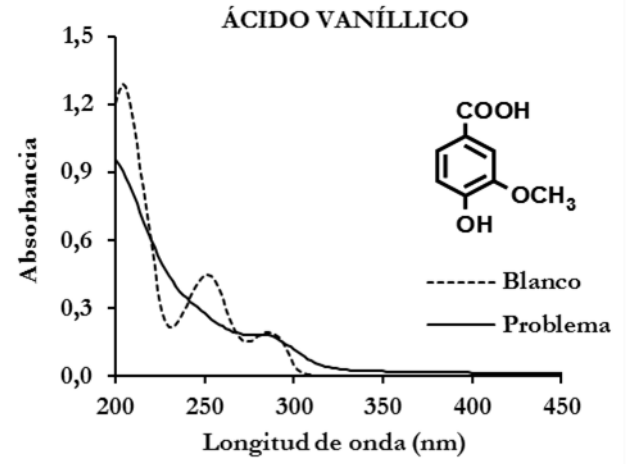
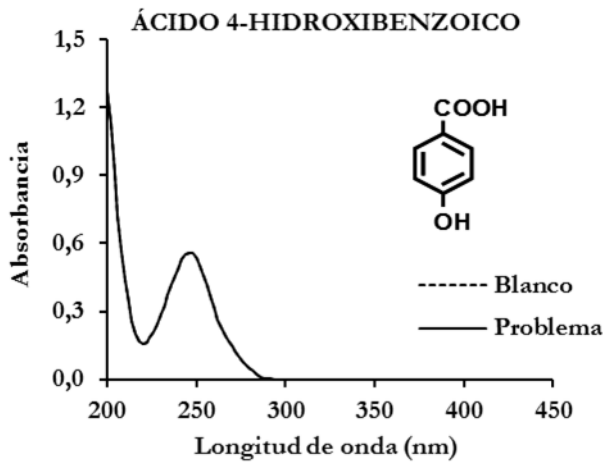
### **3.2.2. Selección de mediadores de la lacasa**

Los sistemas lacasa-mediador permiten expandir el número de compuestos susceptibles de ser degradados por la enzima y ampliar por lo tanto sus posibles aplicaciones. Aunque los primeros estudios fueron realizados empleando mediadores artificiales de la lacasa como ABTS o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), se ha prestado especial atención a la investigación de mediadores naturales, que incluyen metabolitos fúngicos y productos derivados de la degradación de lignina, con el fin de reducir los problemas de toxicidad y coste que puede suponer la utilización los mediadores artificiales (Morozova et al., 2007). Para la realización de este estudio se seleccionaron como posibles mediadores de la lacasa de *C. rigida* alcoholes, aldehídos y ácidos aromáticos, e hidroquinonas cuya estructura corresponde a las tres unidades de la lignina y que, por tanto, pueden derivar de su degradación por los hongos de podredumbre blanca. Concretamente fueron los siguientes: derivados de las unidades 4-hidroxifenilo (H), el alcohol

4-hidroxibencílico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico y la 1,4-benzohidroquinona BQH<sub>2</sub>); derivados de las unidades 4-hidroxi-3-metoxifenilo o guayacilo (G), alcohol vanilílico, vanillina y ácido vanílico; y derivados de las unidades 4-hidroxi-3,5-dimetoxifenilo o siringilo (S), alcohol siringílico, siringaldehído, ácido siríngico y 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona (DBQH<sub>2</sub>). La razón que llevó a esta elección es que varios estudios han demostrado que la mayoría de ellos pueden actuar con mayor o menor eficacia como mediadores naturales de lacasas (Cañas y Camarero, 2010; Johannes y Majcherczyk, 2000; Majeau et al., 2010). Por otro lado, el uso de alcoholes, aldehídos y ácidos aromáticos sustituidos con los mismos radicales, permitiría hacer un estudio comparativo de estos tres grupos de compuestos.

#### **3.2.2.1. Determinación de sustratos de la lacasa**

Como primer paso en la selección de mediadores fue necesario determinar cuáles de ellos eran sustrato de la enzima. Con este fin se realizó un estudio cualitativo de cambios en el espectro de absorción de los compuestos como consecuencia de la acción de la lacasa sobre ellos. Los compuestos que sufrieron algún cambio en su espectro fueron aquellos cuyo anillo de benceno está sustituido por uno o dos grupos metoxilo en posición meta (compuestos de tipo guayacilo o siringilo respectivamente): alcohol vanilílico, vanillina, ácido vanílico, alcohol siringílico, siringaldehído, ácido siríngico y DBQH<sub>2</sub>. El único compuesto derivado de las unidades H cuyo espectro se modificó fue la BQH<sub>2</sub>. La estructura de estos compuestos junto con los espectros al inicio y al final de las reacciones se encuentran en la figura 3.58.



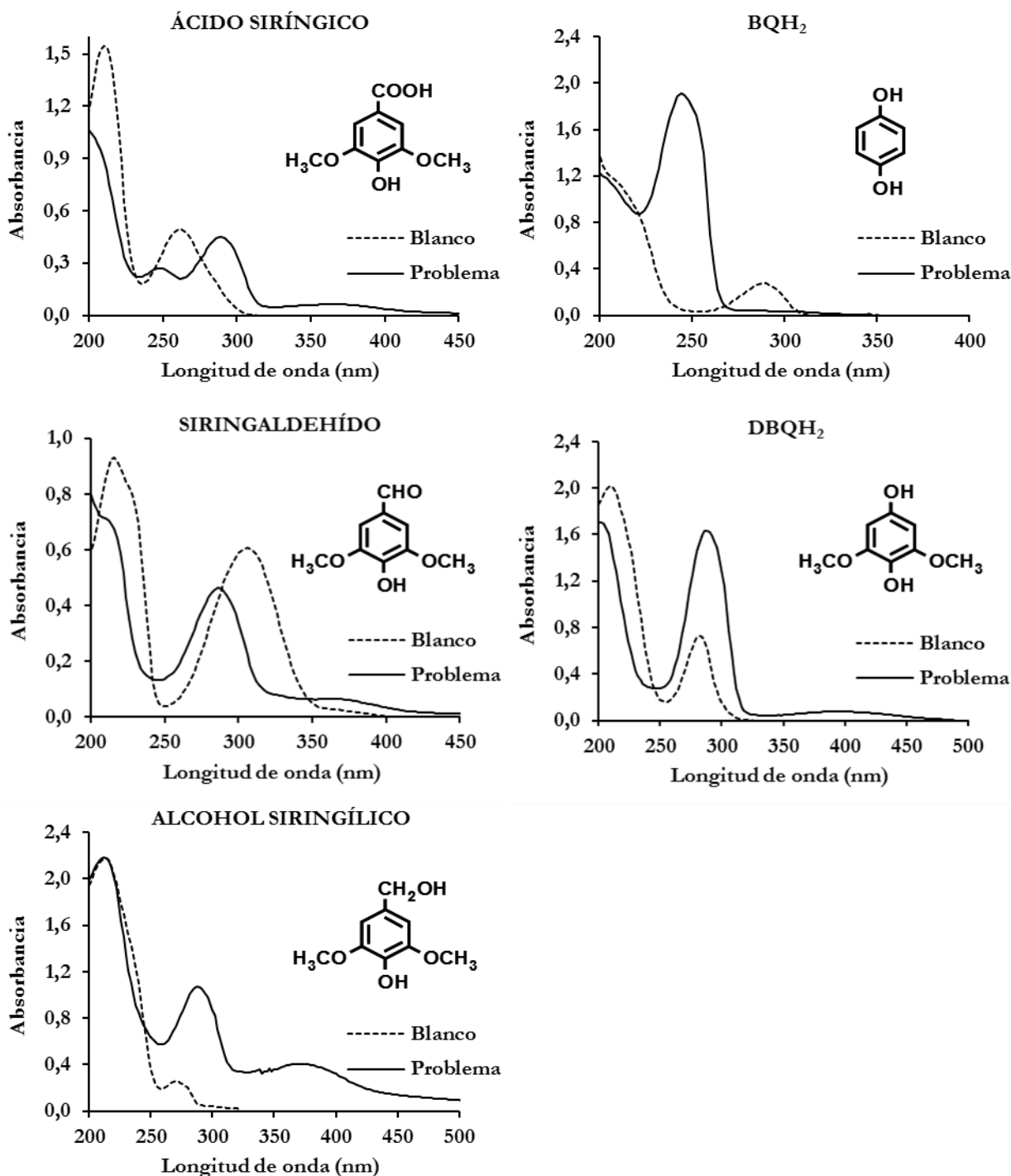


Figura 3.58. Determinación de sustratos de la lacasa de *C. rigida*. Las reacciones contenían los posibles sustratos 500  $\mu\text{M}$  en tampón acetato 20 mM, pH 5. En las reacciones problema se añadieron 300 mU/ml de lacasa. Se muestran los espectros de absorción de las mezclas de reacción y las estructuras de los compuestos fenólicos empleados.

### 3.2.2.2. Identificación de compuestos mediadores

A continuación, para determinar si estos ocho compuestos sustrato de la enzima podían actuar como mediadores de su actividad catalítica, se estudió la influencia de estos compuestos en la velocidad de oxidación de uno de los colorantes cuya oxidación directa por la lacasa tras una hora de incubación rindió resultados negativos (tabla 3.6): Reactive Black 5. En la tabla 3.7 se muestran las velocidades iniciales de decoloración de este compuesto en reacciones de la lacasa llevadas a cabo en presencia de los sustratos seleccionados. Las velocidades más altas se

obtuvieron con el siringaldehído y el alcohol siringílico, que en ambos casos presentan dos grupos metoxilo. Esto podría deberse a que la presencia de esos grupos metoxilo, activantes del anillo de benceno, facilita la oxidación de los compuestos, aumentando la velocidad de producción de radicales fenoxilo. También se comprobó que los aldehídos alcanzaban velocidades de decoloración mayores que los alcoholes correspondientes. Con los tres ácidos y las dos hidroquinonas no se observó decoloración.

**Tabla 3.7. Velocidades iniciales de decoloración de Reactive Black 5 en presencia de mediadores.** Las reacciones se realizaron en tampón acetato 20 mM, pH 5, con 300 mU/ml de lacasa, Reactive Black 25  $\mu$ M y de cada uno de los compuestos fenólicos 500  $\mu$ M.

Mediador	Velocidad (mU A <sub>596</sub> min <sup>-1</sup> )
Sin mediador	0 $\pm$ 0,0
Alcohol vanilílico	15,0 $\pm$ 2,6
Vanillina	16,5 $\pm$ 2,9
Ácido vanílico	0 $\pm$ 0
Alcohol siringílico	109,8 $\pm$ 9,4
Siringaldehído	1248,0 $\pm$ 64,7
Ácido siríngico	0 $\pm$ 0,0
BQH <sub>2</sub>	0 $\pm$ 0,0
DBQH <sub>2</sub>	0 $\pm$ 0,0
DBQH <sub>2</sub> + Fe <sup>3+</sup> -EDTA	48,6 $\pm$ 8,0

Basados en la descripción de la producción de radical hidroxilo en reacciones de oxidación de la DBQH<sub>2</sub> por las lacasas de *P. eryngii* y *C. rigida* llevadas a cabo en presencia de Fe<sup>3+</sup>-EDTA (Guillén et al., 2000a; Saparrat et al., 2002) y en la capacidad de dicho radical para oxidar colorantes, puesta de manifiesto en diferentes procesos de oxidación avanzada (Vinodgopal y Peller, 2003), se realizaron nuevas reacciones de oxidación del colorante con el sistema lacasa-DBQH<sub>2</sub>, a las que se les adicionó el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA. En estas condiciones se observó la oxidación del colorante, poniendo de manifiesto que, aunque la DBQH<sub>2</sub> no actúe como mediador, su oxidación por la lacasa en presencia de Fe<sup>3+</sup> desencadena la producción de  $\cdot$ OH.

En base a estos resultados, se seleccionó al siringaldehído como mediador de la lacasa para sucesivos experimentos. El siringaldehído ha sido descrito como uno de los mejores mediadores naturales de las lacasas producidas por otros hongos ligninolíticos, mostrándose eficaz no sólo en la degradación de colorantes (Camarero et al., 2005; Murugesan et al., 2010), sino también de PAHs (Cañas et al., 2007) y fármacos (Lloret et al., 2010). De estos estudios cabe destacar un ensayo muy similar empleando el mismo colorante y un gran número de mediadores con la lacasa de *P. cinnabarinus* (Camarero et al., 2005) en el cual el siringaldehído también rindió los mejores resultados. Entre las razones que podrían explicar este resultado se encuentran la mayor velocidad de oxidación de estos compuestos debido a su menor potencial redox (hasta 100 veces mayor para el siringaldehído que la vainillina (Camarero et al., 2005)) y la formación de radicales más estables gracias a que presentan dos grupos metoxilo en posición orto, que estabilizan los radicales fenoxilo al impedir reacciones de unión radicalica 5-5' (Cañas y Camarero, 2010).

### 3.2.2.3. Determinación de la concentración óptima de mediador

Una vez seleccionado el siringaldehído, se procedió a determinar la concentración óptima del mismo para su uso en los ensayos de oxidación de los colorantes. En este caso también se empleó el Reactive Black 5. La figura 3.59, gráfico A, muestra la decoloración del mismo en presencia de diferentes concentraciones de siringaldehído. A partir de los datos obtenidos durante los 30 primeros segundos, en los que todas las reacciones fueron lineales, se calcularon las velocidades iniciales de oxidación del colorante. Al representar dichas velocidades frente a la concentración del mediador se observó que la curva obtenida se ajustaba a la hipérbola rectangular del modelo de Michaelis-Menten (figura 3.59, gráfico B). En función de esa curva se calculó indirectamente el valor de la constante de afinidad ( $K_m$ ) de la enzima por el siringaldehído y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) a la que puede ser oxidado en condiciones de saturación de sustrato, mediante la representación doble recíproca de la concentración de siringaldehído y la velocidad de oxidación del Reactive Black 5. De este modo se obtuvieron unos valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de  $50 \mu\text{M}$  y  $12 \text{ mU}_{596}/\text{s}$  respectivamente. Una concentración de 10 veces el valor de la  $K_m$  asegura que la enzima esté saturada y, por tanto, que actúe a su velocidad máxima. Por esta razón, la concentración óptima de siringaldehído a emplear en los ensayos de decoloración se fijó en  $500 \mu\text{M}$ .

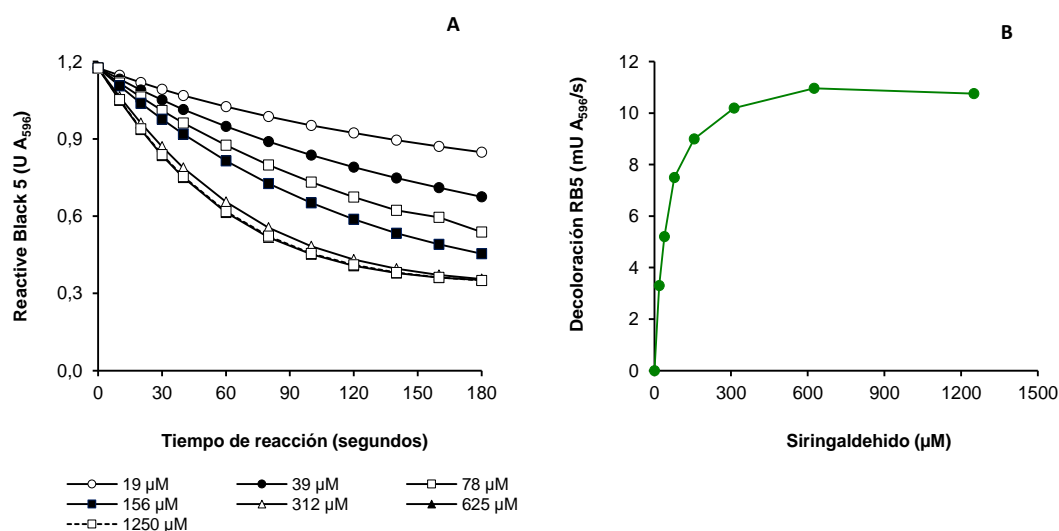


Figura 3.59. Efecto de la concentración de siringaldehído en la decoloración de Reactive Black 5 por la lacasa de *C. rigida*. Las reacciones se realizaron en tampón acetato 20 mM, pH 5, con 40 mU/ml de lacasa, Reactive Black 25  $\mu\text{M}$  y distintas concentraciones de siringaldehído. Se muestra la decoloración frente al tiempo a las diferentes concentraciones de siringaldehído (A) y velocidad de decoloración frente a la concentración de siringaldehído (B).

### 3.2.3. Evaluación *in vitro* del sistema lacasa-mediador

Para estudiar la capacidad degradativa del sistema lacasa-mediador se realizaron estudios dirigidos a la eliminación de los contaminantes recalcitrantes a la acción de la lacasa de *C. rigida*. También se comprobó si el sistema era capaz de oxidar ácido homoverátrico, compuesto modelo de lignina no fenólico, conduciendo a la ruptura del enlace  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  del mismo.

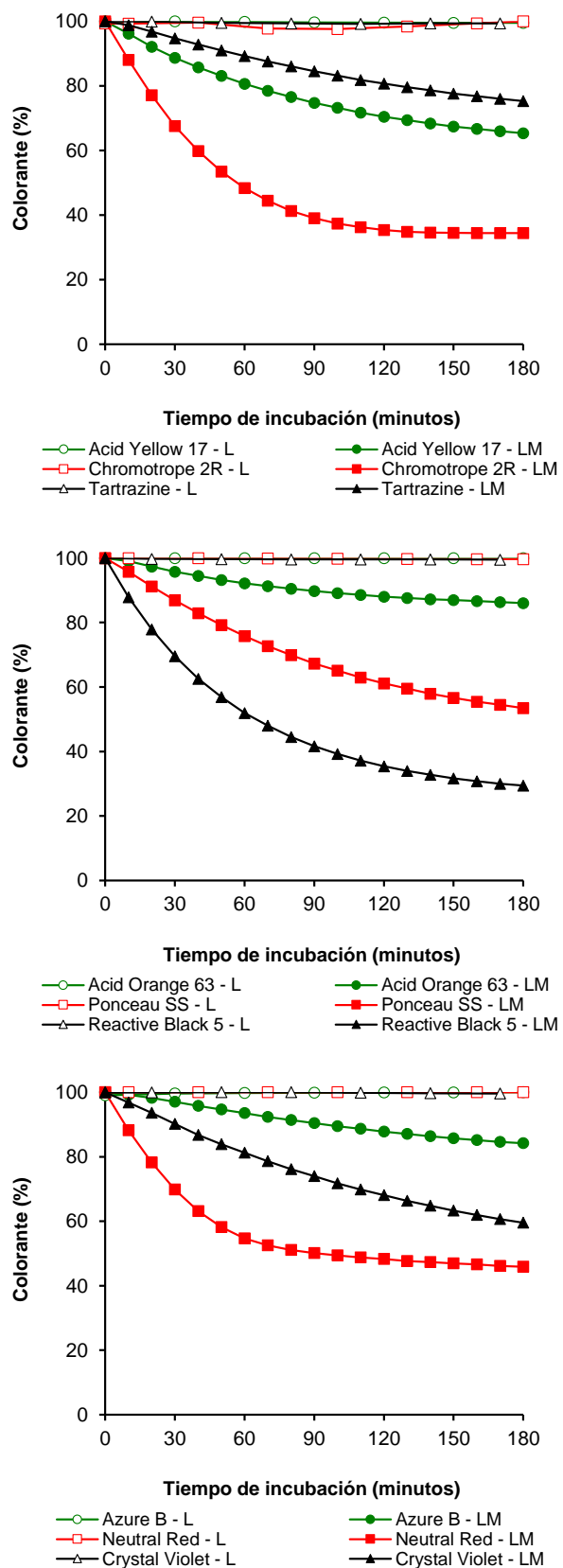
#### 3.2.3.1. Degradación de colorantes por el sistema lacasa-siringaldehído

La eficacia del sistema lacasa-siringaldehído se evaluó con los colorantes que no habían sido oxidados directamente por la lacasa o habían alcanzado porcentajes de decoloración inferiores al 10% en 1 hora de reacción. En concreto fueron nueve los colorantes que cumplieron ese criterio. La figura 3.60 muestra como la presencia de siringaldehído en las reacciones condujo a



la oxidación de todos los colorantes en mayor o menor grado, incluyendo al Acid Yellow y Tartrazine que no habían sido oxidados por la enzima. El otro colorante de tipo azo ensayado, Chromotrope 2R, que alcanzó un 4% de decoloración en 1 hora directamente por la enzima, sufrió esta vez una decoloración del 32% en tan sólo 30 segundos de reacción. Este incremento notable de la velocidad de decoloración se observó también con los seis colorantes restantes, siendo destacable el caso del Reactive Black 5, que pasó de un 0% de decoloración en 1 hora al emplear únicamente la lacasa, a un 30% en 30 segundos al añadir siringaldehído a la reacción.

Las velocidades iniciales de decoloración de los nueve compuestos, calculadas con los datos obtenidos durante los primeros 30 segundos de reacción, se presentan en la figura 3.61. Las velocidades más elevadas se produjeron en los casos del Chromotrope 2R, Reactive Black 5 y Neutral Red, superando el 60% de decoloración/min. Sólo con dos colorantes (Tartrazine y Acid Orange 63) no se superó el 10% de decoloración/min.



**Figura 3.60. Oxidación de colorantes por el sistema lacasa-siringaldehído.** Las reacciones se llevaron a cabo en tampón acetato 20mM pH 5, con 300mU/ml de lacasa, 25  $\mu$ M de cada uno de los colorantes en ausencia (L) o presencia de siringaldehído 500  $\mu$ M (LM)

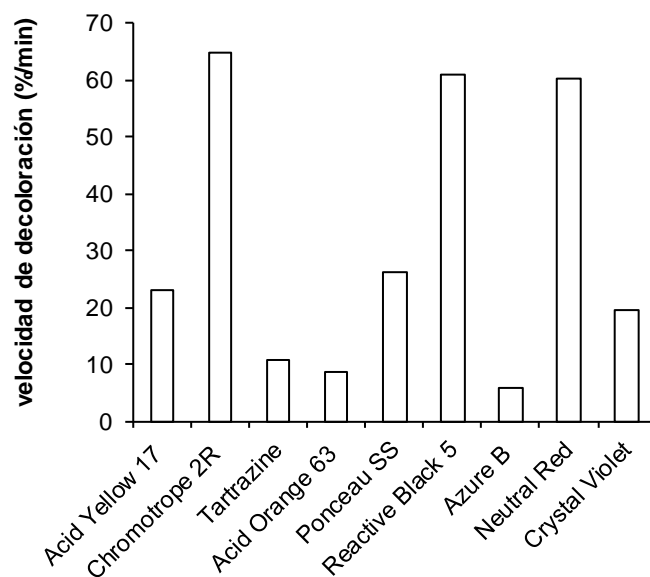
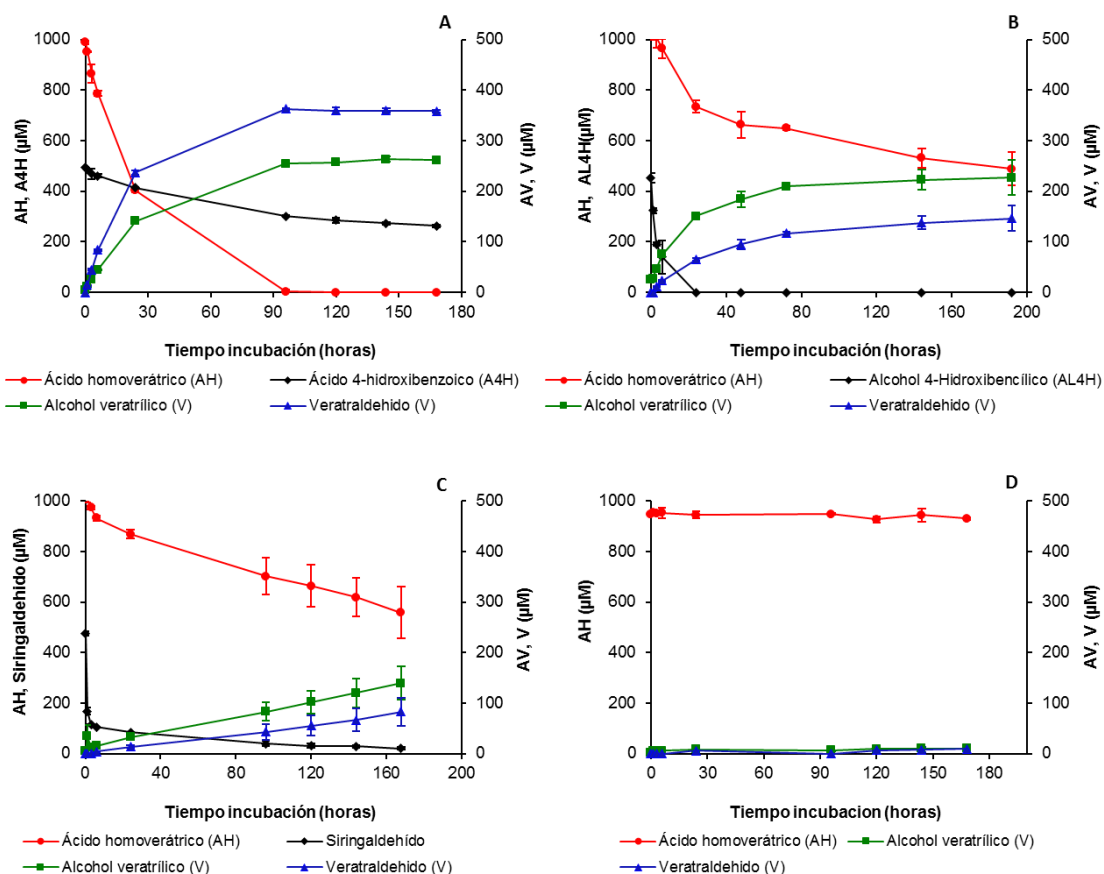


Figura 3.61. Velocidad de oxidación de los colorantes mostrados en la figura 3.60.

### 3.2.3.2. Degradación de ácido homoverátrico por el sistema lacasa-mediador

El sistema lacasa siringaldehído fue empleado también para la degradación de ácido homoverátrico a fin de comprobar si dicho sistema era capaz de promover la ruptura del enlace  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  de dicho compuesto. Los niveles de degradación observados en dicho experimento fueron muy discretos en comparación a los obtenidos con los colorantes (resultados no mostrados), por lo que se decidió realizar un nuevo ensayo para probar otros mediadores como el ácido 4-hidroxibenzoico, con el cual se han descrito los mejores resultados de degradación de PAH (Johannes y Majcherczyk, 2000). En este experimento a su vez se prolongaron los tiempos de reacción y se aumentó la cantidad de lacasa presente en las reacciones. En base a dicho planteamiento se decidió usar ácido 4-hidroxibenzoico y alcohol 4-hidroxibencílico, empleando 1U/ml de lacasa, y ácido siríngico con 300 mU/ml de lacasa, puesto que la actividad de esta sobre dicho sustrato es superior. Durante el experimento se determinó mediante HPLC la concentración de mediador y de ácido homoverátrico, así como de los productos de oxidación de este, alcohol verátrico y veratraldehído, tal y como se muestra en la figura 3.62.



**Figura 3.62. Degradación de ácido homoverátrico por el sistema lacasa-mediador.** Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 100mM pH 4,5, empleando ácido homoverátrico 1mM, Ácido 4-hidroxibenzoico (A), Alcohol 4-hidroxibencilico (B), Siringaldehído (C) 0,5mM o en ausencia de mediador (D) y con 1U/ml de la enzima purificada salvo en el caso del en el caso del siringaldehído (C), que contenía 300mU/ml.

Los mejores resultados se obtuvieron en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico, siendo el único caso en el cual se alcanzó la degradación total del ácido homoverátrico. Este último, sin embargo había sido descartado como sustrato de la lacasa previamente en base a que no se produjeron cambios de espectro en presencia de la enzima, probablemente debido al alto potencial redox de este compuesto. La mayor cantidad de lacasa empleada en este experimento de degradación de homoverátrico posiblemente sea la explicación a esta discrepancia de resultados. Además es posible que, pese a que la reacción no sea termodinámicamente favorable, pueda transcurrir si los productos de la reacción, en este caso la forma oxidada del mediador, son retirados de la reacción, por ejemplo al actuar sobre el ácido homoverátrico. El alto potencial redox que dificulta la acción de la lacasa puede ser también la razón que permita a este mediador llevar a cabo la oxidación del ácido homoverátrico, que también posee un alto potencial redox, con mayor eficiencia. Por lo tanto, tal y como apuntaban los autores del trabajo, para que un compuesto resulte óptimo como mediador, debe darse un equilibrio entre el potencial redox de la enzima y del mediador, que influirá en la velocidad a la que éste se oxida, y entre el mediador (o la forma oxidada de este) y el compuesto a degradar, que determinará la efectividad del mediador en la degradación del compuesto objetivo.

Cabe destacar también de los resultados obtenidos en la degradación de ácido homoverátrico con ácido 4-hidroxibenzoico como mediador, la capacidad de reciclado de este último, puesto

que se eliminó una concentración 1mM de ácido homoverátrico consumiéndose aproximadamente la mitad de la cantidad de ácido 4-hidroxibenzoico añadida, que fue de 500  $\mu$ M. Esta gran capacidad de reciclado es una de las que se espera de un mediador ideal, que sería aquel capaz de generar un radical estable, que no inactive la enzima y cuya reacción conduzca a su reciclado sin pérdidas (Cañas y Camarero, 2010). Dado que en esta ocasión, el ácido 4-hidroxibenzoico no presenta grupos metoxilo que estabilicen el radical, es posible que su alta tasa de reciclado sea debida a la baja velocidad a la que éste se genera dado su alto potencial redox, permaneciendo baja su concentración, lo que reduce la posibilidad de reacciones de unión radicálica.

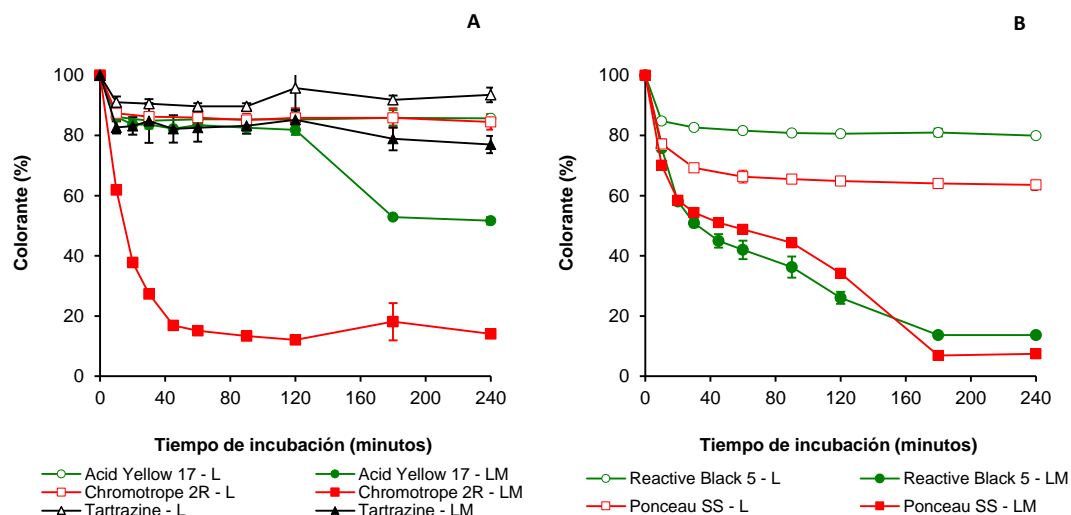
De los resultados obtenidos en los experimentos realizados con el sistema lacasa-mediador puede deducirse por tanto que no puede emplearse un mediador universal para la eliminación de contaminantes, sino que deberán realizarse estudios del mediador óptimo para cada compuesto y condiciones de reacción. Para la degradación de compuestos de bajo potencial redox podrá ser posible la aplicación de mediadores que también presenten un bajo potencial redox y que sean rápidamente oxidados por la lacasa, dando lugar a una rápida degradación del compuesto; mientras que al tratar con compuestos con potenciales redox altos también hayan de serlo los de los mediadores empleados, considerando un balance entre la velocidad de oxidación de la lacasa sobre el mediador y la efectividad de este sobre el compuesto a eliminar.

#### **3.2.4. Degradación in vivo mediante el sistema lacasa-mediador de *C. rigida***

##### **3.2.4.1. Degradación de colorantes mediante el sistema lacasa-siringaldehído.**

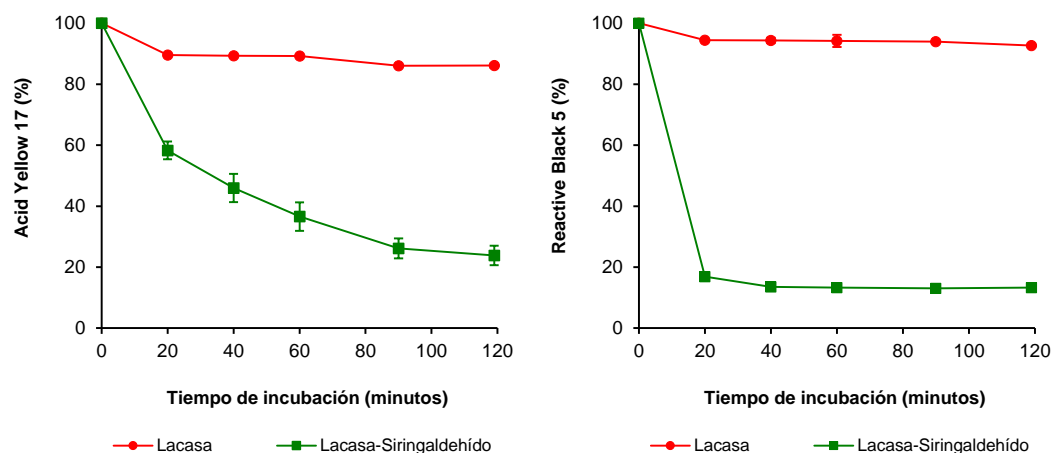
A fin de comprobar la viabilidad del sistema lacasa-mediador *in vivo* se prepararon incubaciones de micelio lavado con los colorantes más recalcitrantes a la oxidación directa por la lacasa, al igual que se hizo en el caso del ensayo del sistema lacasa-siringaldehído *in vitro*. Sin embargo, cuatro de esos nueve colorantes tuvieron que ser descartados del ensayo debido a que se producía una fuerte adsorción de los mismos al micelio. Los 5 colorantes finalmente empleados fueron tres azo (Acid Yellow 17, Tartrazine y Chromotrope 2R) y dos diazo (Ponceau SS y Reactive Black 5).

La representación gráfica de los resultados (figura 3.63) muestra que en todos los casos se consiguió un nivel significativo de decoloración tras 4 horas de incubación. Los mejores resultados se obtuvieron con Chromotrope 2R, Ponceau SS y Reactive Black 5, superando el 85% de decoloración al final de la incubación. Por el contrario, con Tartrazine se observa el peor resultado, con tan sólo un 23% de decoloración en el mismo tiempo. El descenso de absorbancia observado en la primera muestra de las incubaciones sin siringaldehído posiblemente es debido a una cierta adsorción al micelo. Salvo en el caso del Chromotrope 2R, los perfiles de decoloración fueron diferentes a los observados en las reacciones lacasa-mediador *in vitro* (figura 3.60), en las que el descenso de absorbancia fue lineal desde el comienzo. Concretamente, con Acid Yellow la decoloración sufrió una fase de retraso de 2 horas y con Ponceau SS y Reactive Black 5, se observó un descenso de la velocidad de decoloración hacia la mitad del experimento, para volver a aumentar hasta finalizar la decoloración. Aunque se desconozcan las causas de estas diferencias en los perfiles, posiblemente se pusieron de manifiesto por la baja actividad lacasa asociada al micelio empleado en estos experimentos.



**Figura 3.63. Oxidación de colorantes por el sistema lacasa-siringaldehído *in vivo*.** Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5, con 50  $\mu$ M de cada uno de los colorantes y  $4,1 \pm 0,1$  mg/ml de micelio en ausencia (L) o presencia de siringaldehído 500  $\mu$ M (LM).

Con objeto de comprobar la posibilidad que se acaba de mencionar, se llevó a cabo un experimento similar con micelio productor de mayores niveles de lacasa (inducida con 40  $\mu$ M de cobre). Los colorantes empleados fueron Acid Yellow 17 y Reactive Black 5. En ambos casos, se observó un incremento notable de la velocidad de decoloración, con lo que no se apreció la fase de retraso del Acid Yellow 17 ni los cambios en la velocidad de decoloración del Reactive Black 5 (figura 3.64).



**Figura 3.64. Oxidación de Acid Yellow 17 y Reactive Black 5 por el sistema lacasa-siringaldehído *in vivo*.** Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5, con 50  $\mu$ M de cada uno de los colorantes y  $5,3 \pm 0,2$  mg/ml de micelio en ausencia (L) o presencia de siringaldehído 500  $\mu$ M (LM). Los valores mostrados son la media de tres incubaciones así como su desviación estándar.

Estudios más extensos en este área podrían resultar interesantes al obtenerse la combinación de la capacidad degradativa del hongo con la del sistema lacasa-mediador, que pueda dar lugar a una mayor tasa de degradación de intermediarios y destoxificación. Sin embargo también habría que tratar con contrapartidas como la derivada de una menor cantidad de lacasa

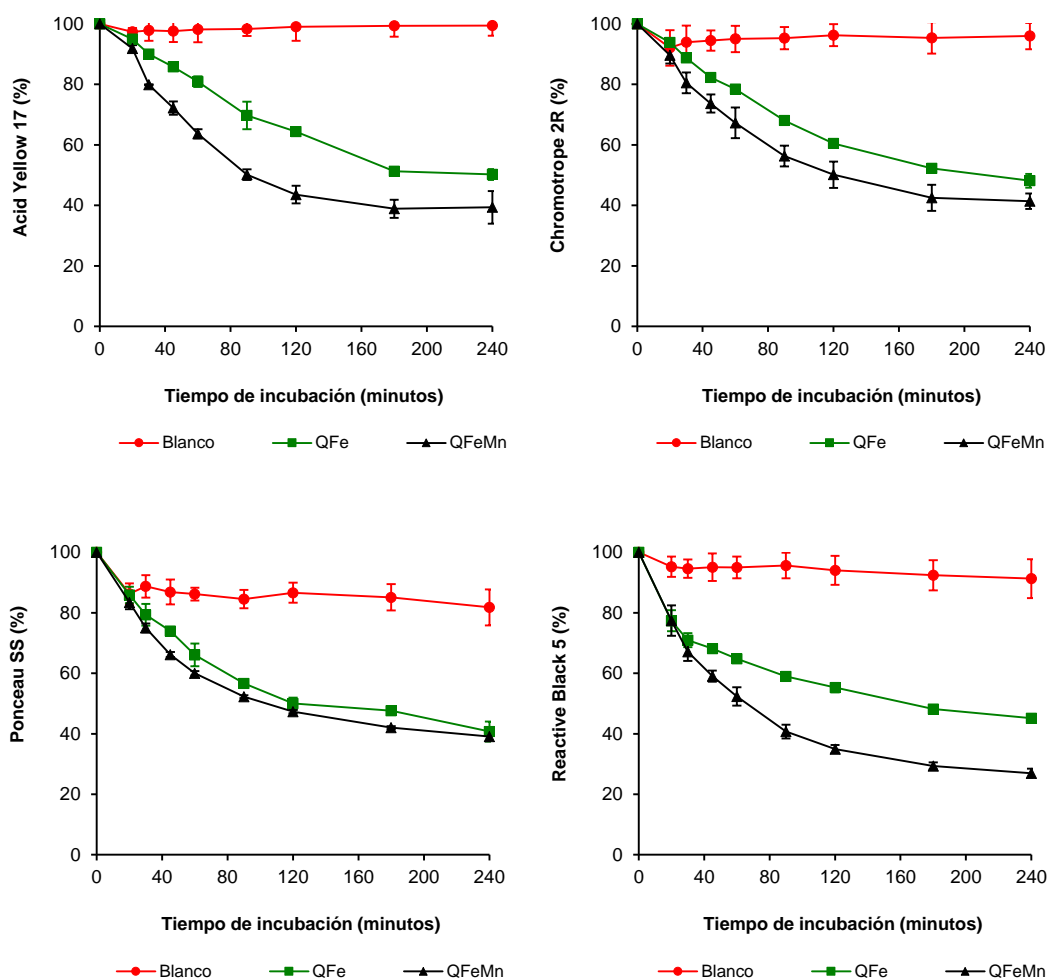
presente tal y como se comprobó en esta serie de experimentos, o la posible interacción de los mediadores con el hongo y los metabolitos de este.

### **3.2.5. Biooxidación avanzada de colorantes.**

A fin de comprobar si la inducción de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  aumentaba la capacidad degradativa de *C. rigida* se llevó a cabo un ensayo de biooxidación avanzada con colorantes. La degradación de colorantes se realizó tanto a pH 5,0, en condiciones en las cuales la lacasa fuese activa, como a pH 7 donde la enzima ya no presenta actividad (figura 3.3). Para ello se emplearon cuatro de los colorantes que no habían sido degradados o presentaban bajos niveles de degradación por la lacasa: Reactive Black 5, Chromotrope 2R, Ponceau SS y Acid Yellow 17.

#### **3.2.5.1. Biooxidación avanzada de colorantes a pH 5**

Se realizaron incubaciones del hongo con los colorantes seleccionados empleando micelio con lacasa inducida y el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA, puesto que en dichas condiciones se habían obtenido los mejores resultados de producción de TBARS (figura 3.10). Las incubaciones se llevaron también en presencia y ausencia de  $\text{Mn}^{2+}$  para potenciar la capacidad degradativa del sistema. Tal y como se observa en la figura 3.65, las tasas de decoloración de todos los compuestos fueron superiores al 50% tras 4 horas de incubación. La presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  incrementó la velocidad de decoloración de tres de los cuatro colorantes, siendo dicho efecto especialmente relevante en las incubaciones con Acid Yellow 17 y Reactive Black 5, en las que el porcentaje de decoloración fue un 20% mayor tras 2 horas de incubación.



**Figura 3.65. Biooxidación avanzada de colorantes por *C. rigida* a pH 5.** Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 5 con 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, colorantes 50  $\mu$ M, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M y 5,0  $\pm$  0,1 mg/ml de micelio. Los casos con Mn<sup>2</sup> contenían MnSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M.

### 3.2.5.2. Biooxidación avanzada de colorantes a pH 7

La degradación de los colorantes a pH 7,0 se realizó, empleando el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA, condiciones que habían rendido los mejores resultados en cuanto a producción de TBARS (figura 3.11). Mediante la inducción de radicales  $\cdot$ OH se consiguió la degradación de todos los colorantes, alcanzándose porcentajes de decoloración superiores al 60 % en todos los casos a las 2 horas de incubación (figura 3.66), tras ese momento la decoloración se detuvo, posiblemente debido a la interrupción de la producción de  $\cdot$ OH.



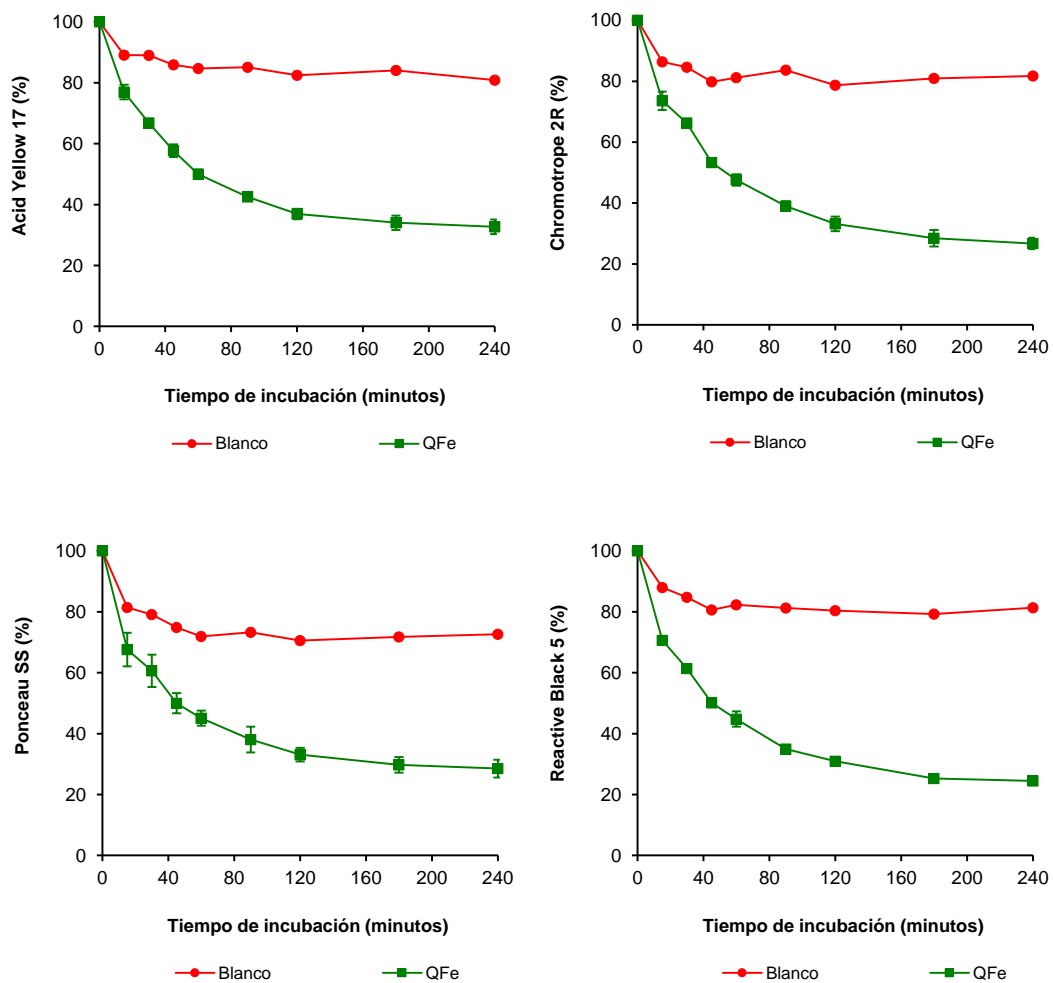


Figura 3.66. Biooxidación avanzada de colorantes por *C. rigida* a pH 7. Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 20mM pH 7 con 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, colorantes 50  $\mu$ M, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M y 5,2  $\pm$  0,3 mg/ml de micelio.

La figura 3.67 muestra los porcentajes de decoloración obtenidos para los cuatro colorantes tras 2 h de incubación, en las tres condiciones ensayadas. En ella se aprecia como los mejores resultados se obtuvieron a pH 7 en todos los casos, mostrando una correlación entre la velocidad de decoloración y la producción de radicales  $\cdot$ OH, puesto que en dichas condiciones se obtuvo una mayor producción de TBARS (apartado 3.1.1.4.2).

Cabe destacar finalmente la variedad de sistemas y condiciones en las que se ha demostrado la eliminación de colorantes textiles por *C. rigida*, tanto mediante la acción directa de la lacasa como de los sistemas lacasa-mediador *in vitro* e *in vivo* con aquellos colorantes más recalcitrantes, y finalmente mediante biooxidación avanzada, incluso a valores de pH a los cuales la lacasa se encuentra inactiva. Este último resultado resulta especialmente interesante puesto que incrementa notablemente el número de procesos de tratamiento de contaminantes en los que se podría aplicar este hongo, incluso cuando las condiciones del proceso sean desfavorables para la acción de la actividad lacasa.

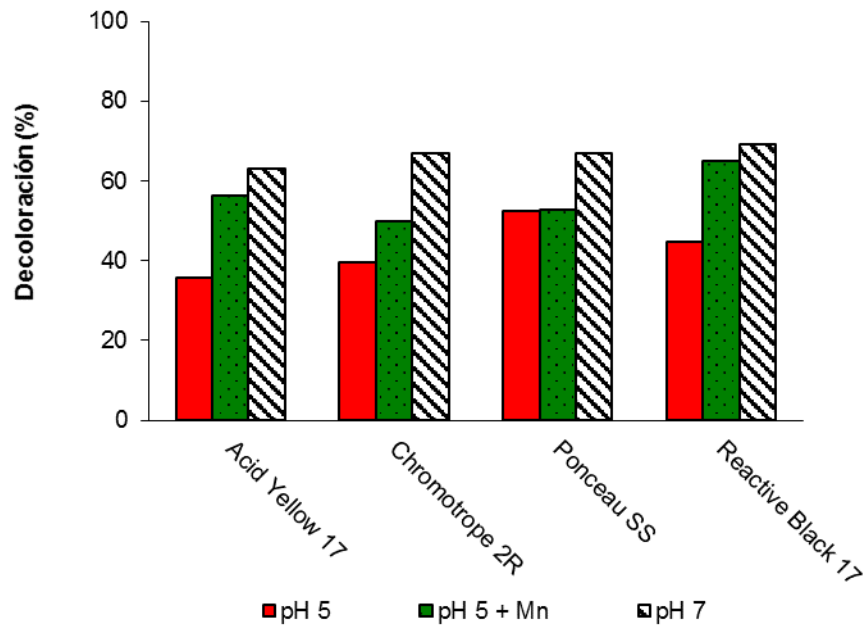


Figura 3.67. Porcentajes de decoloración de Acid Yellow 17, Chromotrope 2R, Ponceau SS y Reactive Black 17 tras dos horas de incubación, calculados a partir de los datos de las figuras 3.65 y 3.66.

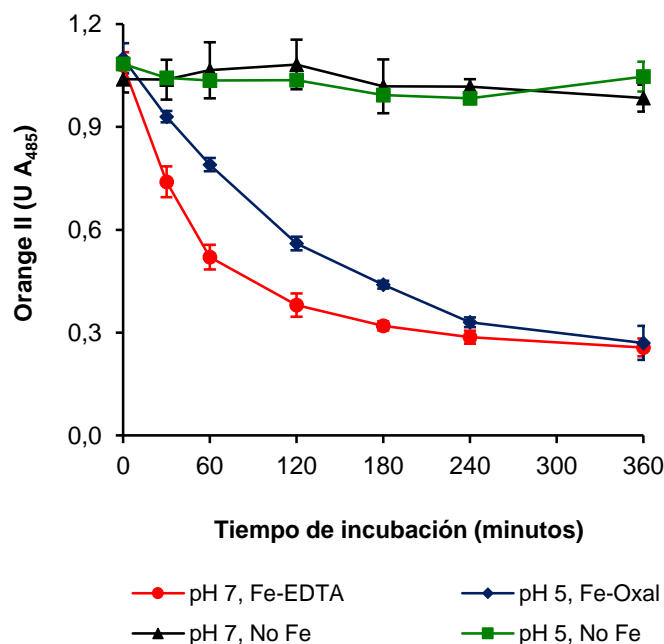
### 3.3. BIOOXIDACIÓN AVANZADA DE CONTAMINANTES POR *A. nidulans*

Los resultados de biooxidación avanzada de contaminantes por *A. nidulans* se han dividido en dos subapartados en función de los grupos de contaminantes ensayados, en primer lugar colorantes textiles y a continuación fármacos y disruptores endocrinos

#### 3.3.1. Degradación de colorantes textiles

En el primer estudio dedicado a comprobar la capacidad degradativa del sistema de producción de  $\cdot\text{OH}$  inducible en *A. nidulans* mediante el ciclo redox de la 2,6-DBQ, se emplearon ocho colorantes textiles de tipo azo: Acid Yellow 17, Tropaeolin O, Tartrazine, New Coccine, Methyl Orange, Chromotrope 2R, Crocein Orange G y Orange II. En el experimento se valoró la capacidad de decoloración, medida como el descenso de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción en el espectro visible de cada colorante, y la capacidad de degradación, determinándose la concentración de colorante mediante HPLC.

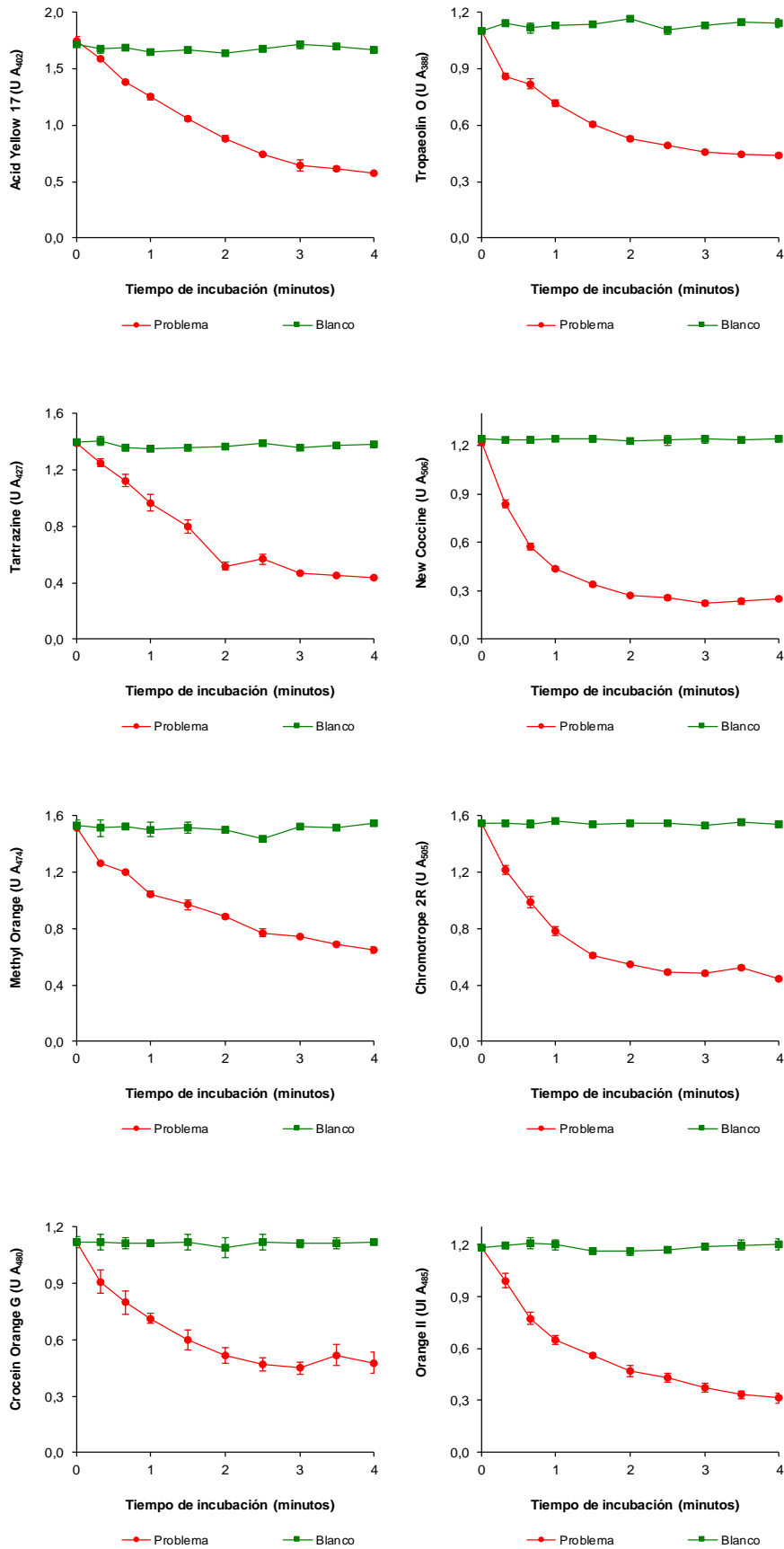
En un primer ensayo se llevó a cabo la incubación de *A. nidulans* con Orange II en presencia de 2,6-DBQ, tanto a pH 5,0 como a pH 7,0, empleando para ello el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxalato y  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA respectivamente. En ambos casos se obtuvo la decoloración parcial del compuesto, si bien la velocidad de decoloración en las incubaciones realizadas a pH 7,0 fue mayor, tal y como está representado en la figura 3.68. De esta forma se pudo comprobar el efecto de los  $\cdot\text{OH}$  sobre la degradación de colorantes ya que estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos para la producción de TBARS (apartado 3.2.2.2.1), donde se observó una mayor velocidad de producción de dichas sustancias en las incubaciones con  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA a pH 7,0 (figura 3.28).



**Figura 3.68. Decoloración de Orange II por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 o pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , Orange II 50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  o ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$  según se indique y  $2,4 \pm 0,1$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm.

Dado que la inducción de la producción de  $\cdot\text{OH}$  a pH 7 resultó especialmente efectiva para la decoloración del Orange II, se aplicaron esas condiciones para todos los colorantes. Los perfiles de decoloración obtenidos se muestran en la figura 3.69, incluyendo de nuevo a efectos comparativos el del Orange II. En estas incubaciones se alcanzaron como mínimo porcentajes de decoloración cercanos al 60 % tras 4 horas de incubación, si bien cabe destacar que el proceso es relativamente rápido y la mayor velocidad de decoloración se alcanza en los primeros momentos de la incubación, decolorándose más del 20 % del compuesto a los 40 minutos en todos los casos. Los mejores resultados se obtuvieron con New Coccine, Chromotrope 2R y Orange II con porcentajes de decoloración a las 4h del  $79,5 \pm 0,4$ ,  $71,4 \pm 0,5$  y  $73,4 \pm 2,5$  % respectivamente y a los 40 minutos del  $53,0 \pm 1,0$ ,  $36,2 \pm 2,4$  y  $34,7 \pm 3,0$  %, respectivamente. Un menor grado de decoloración fue obtenido con Methyl Orange y Crocein Orange G, cuyos porcentajes de decoloración a las 4 horas fueron de  $57,1 \pm 1,9$  y  $57,1 \pm 5,0$  %, respectivamente.

Si bien estos eran buenos resultados, el análisis por HPLC de las muestras reveló que la eliminación de los colorantes había sido mayor de lo que los ensayos de decoloración mostraban, habiendo sido alcanzada la eliminación completa o casi completa de los colorantes, tal y como se puede apreciar en la figura 3.70. Los únicos casos en los cuales la degradación no fue completa fueron los de Acid Yellow, New Coccine, Methyl Orange y Orange II, con porcentajes de degradación del  $91,3 \pm 1,4$ ,  $97,3 \pm 0,3$ ,  $92,1 \pm 0,2$  y  $95,7 \pm 0,3$  % respectivamente tras 4 horas. Con el resto de colorantes se alcanzó la completa eliminación en tiempos inferiores a las 4 horas de incubación. La mayor velocidad de degradación se obtuvo en el caso del Tropaeolin O, siendo eliminado en tan solo 1,5 horas. Tal y como se había observado para la decoloración, la mayor parte de la degradación ocurrió en los primeros instantes de la incubación, con porcentajes de degradación entre el 50 y 80 % en los primeros 40 minutos, salvo en el caso del Acid Yellow, con un  $34,2 \pm 3,9$  %.



**Figura 3.69. Decoloración de colorantes textiles por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, colorante 50  $\mu$ M, Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M y 2,4  $\pm$  0,1 mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm.

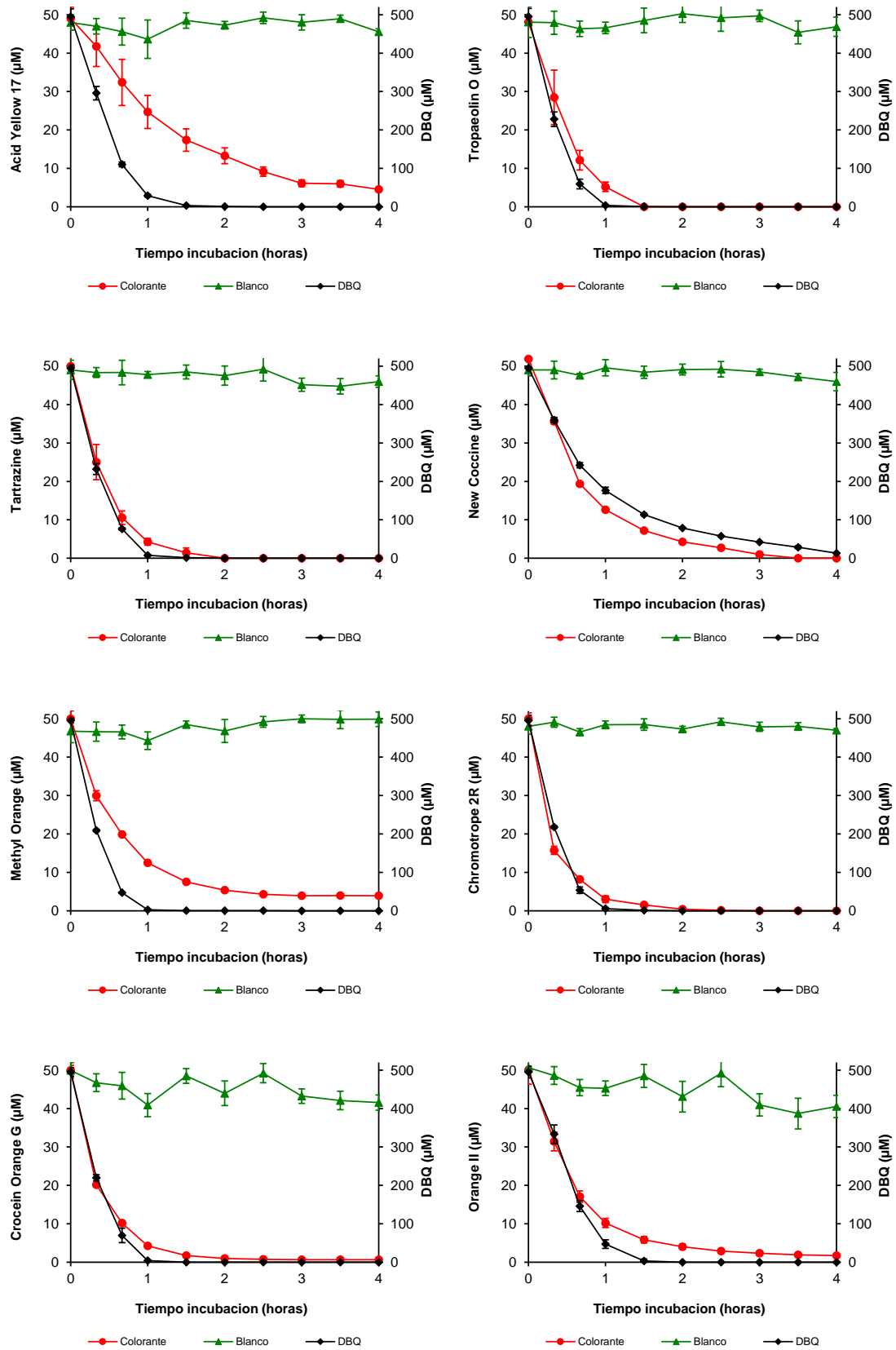


Figura 3.70. Degradación de colorantes textiles por *A. nidulans*. Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ , colorante 50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  y  $2,5 \pm 0,3$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm.

A modo de comparación entre los dos tipos de análisis llevados a cabo para valorar la eficacia de la producción de  $\cdot\text{OH}$  sobre los colorantes textiles, en la figura 3.71 se presentan los porcentajes de decoloración y de degradación obtenidos a las 1 y 4 h de incubación. Como se puede comprobar, los porcentajes de degradación son superiores a los de decoloración en todos los casos. La explicación a dicho fenómeno puede ser la generación de intermediarios coloreados que enmascararían la degradación del colorante en los ensayos de decoloración.

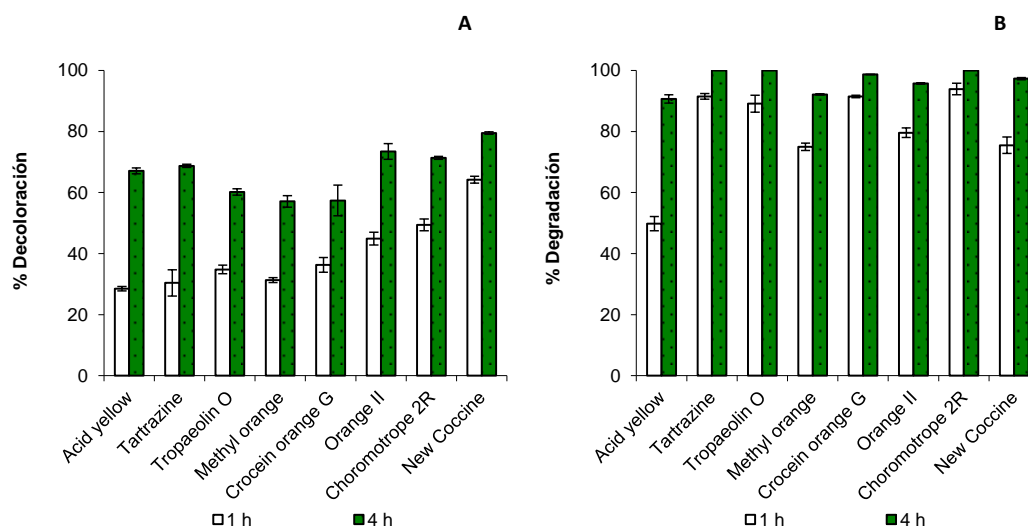
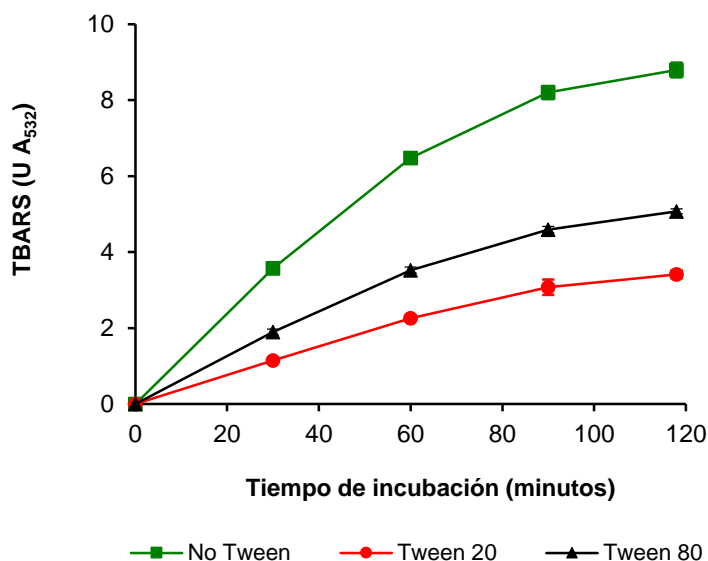


Figura 3.71. Porcentajes de decoloración (A) y degradación (B) de colorantes por *A. nidulans* tras 1 y 4 h obtenidos de los datos representados en las figuras 3.69 y 3.70.

### 3.3.2. Degradación de fármacos y disruptores endocrinos

Un segundo estudio para aplicar las condiciones óptimas de producción de  $\cdot\text{OH}$  determinadas para *A. nidulans* se realizó empleando contaminantes emergentes de las aguas como modelos para el ensayo, entre los que se encuentran 5 fármacos y un disruptor endocrino. Los fármacos seleccionados fueron: dos analgésicos, paracetamol y naproxeno, dos fluoroquinolonas de segunda generación, ciprofloxacino y norfloxacino, y un regulador lipídico, ácido clofíbrico. El disruptor endocrino seleccionado fue el bisfenol A.

La concentración elegida de los compuestos a degradar en las incubaciones con *A. nidulans* fue de 400  $\mu\text{M}$ , empleándose la misma concentración de 2,6-DBQ a fin de mantener una relación 1:1 entre ambos compuestos en dichos ensayos. Sin embargo, la baja solubilidad del naproxeno hacía necesaria la presencia de agentes emulsionantes en la mezcla de incubación. Una concentración del 0,2% de los dos agentes emulsionantes ensayados, Tween 20 y Tween 80, permitió solubilizar al naproxeno a la concentración deseada de 400  $\mu\text{M}$ , por lo que se realizó un nuevo estudio para valorar cual de dichos agentes conllevaba un menor secuestro de  $\cdot\text{OH}$ . El experimento consistió en una serie de incubaciones del hongo en condiciones de producción de  $\cdot\text{OH}$  con ambos agentes emulsionantes y 2-desoxirribosa para valorar la producción de TBARS en cada uno de los supuestos.

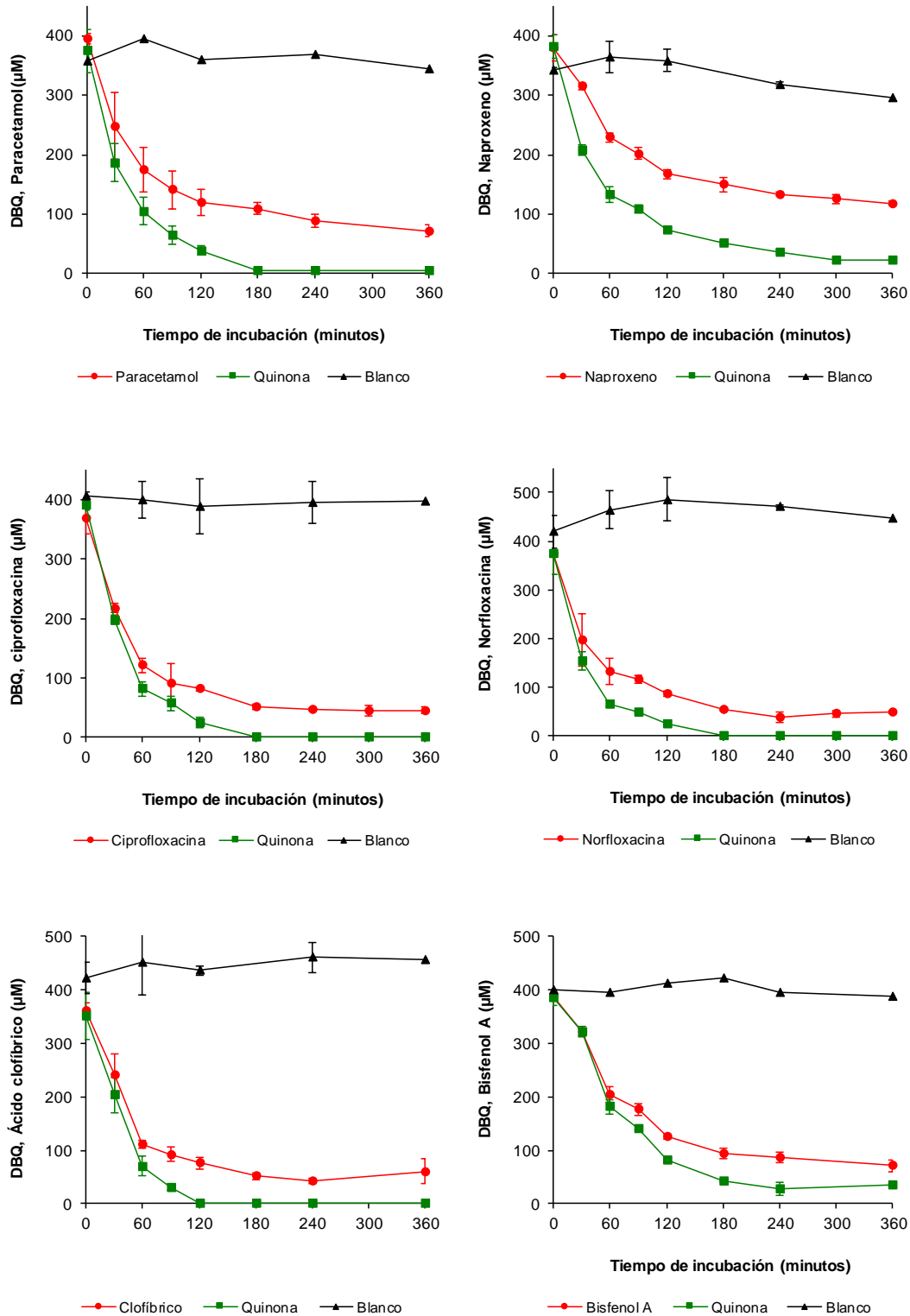


**Figura 3.72. Efecto de la adición de agentes emulsionantes en las incubaciones sobre la producción de TBARS.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, 2-desoxirribosa 2,8 mM, Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M, Tween 20 o Tween 80 al 0,2% y 2,4  $\pm$  0,1 mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo a 37°C y 180rpm.

Tal y como se muestra en la figura 3.72, la presencia de ambos agentes emulsionantes supuso una reducción sustancial de la producción de TBARS de aproximadamente 2 y 3 veces con Tween 20 y Tween 80 respectivamente, frente al control en ausencia de los mismos. La velocidad inicial de producción de TBARS, calculada con los datos obtenidos hasta los 60 minutos, fue de  $37,6 \pm 1,1$  mU A<sub>532</sub>/min con Tween 20 y de  $58,8 \pm 1,3$  mU A<sub>532</sub>/min con Tween 80, por lo que se seleccionó este último como agente emulsionante para solubilizar el naproxeno.

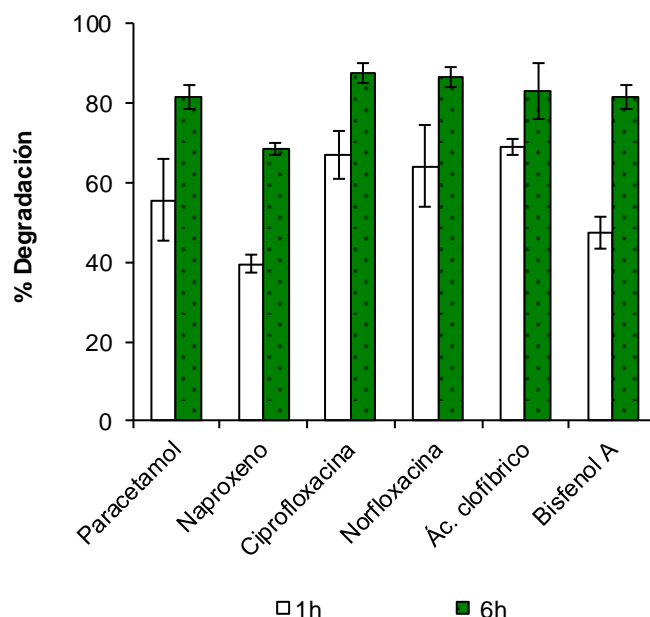
La degradación de los contaminantes emergentes seleccionados se realizó a pH 7, empleando el complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA. Los resultados representados en la figura 3.73 muestran la rápida desaparición de todos los compuestos ensayados, especialmente durante la primera hora de incubación, obteniéndose concentraciones por debajo de 100  $\mu$ M al final del experimento, salvo en el caso del naproxeno, posiblemente debido a la presencia del Tween 80, que tal y como se había comprobado previamente secuestra parte de los  $\cdot$ OH producidos. En la misma figura se puede apreciar que al disminuir la concentración de DBQ también lo hace la velocidad de degradación de los fármacos, deteniéndose la degradación de los mismos al agotarse la DBQ.





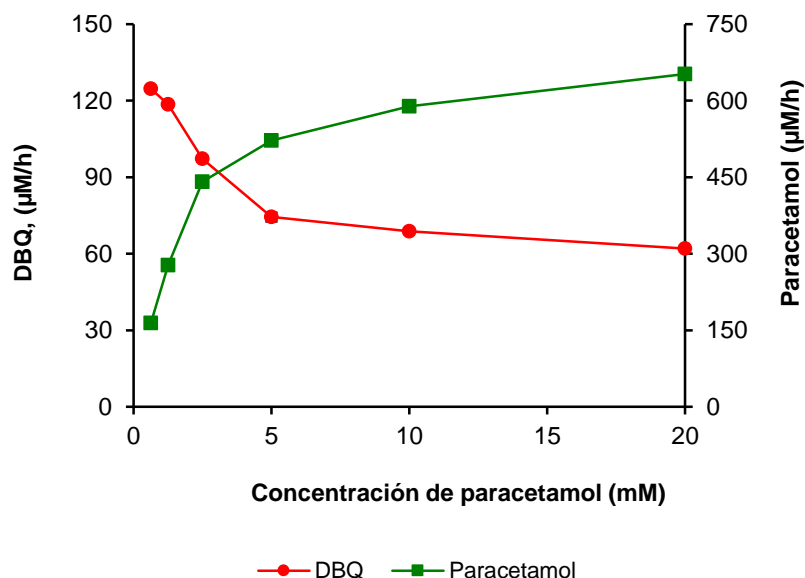
**Figura 3.73. Biooxidación de contaminantes emergentes por *A. nidulans*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7, contenían 2,6-DBQ 400 µM, FeCl<sub>3</sub> 100 µM y EDTA 110 µM así como micelio de 3 días y se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 33ml de mezcla de incubación, a 37°C y 180rpm. Los blancos carecían del complejo Fe<sup>3+</sup>-EDTA y las incubaciones del naproxeno contenían Tween 80 al 0,2%. Las cantidades de micelio empleadas fueron 3,4 ± 0,1mg/ml para el paracetamol, 2,5 ± 0,2 mg/ml para el naproxeno, 2,4 ± 0,1 mg/ml para el ciprofloxacino, 2,4 ± 0,0 mg/ml para el norfloxacino, 3,5 ± 0,1 mg/ml para e ácido clofibrico y 2,0 ± 0,1 mg/ml para el bisfenol A.

A partir de los resultados del experimento se calcularon también porcentajes de degradación a los distintos tiempos de muestreo, presentándose los obtenidos a las 1 y 6 h de incubación en la figura 3.74. Los porcentajes de degradación alcanzados tras 1 h de incubación oscilaron entre el 45 y 70, y a las 6h fueron superiores al 80%, con la excepción una vez más de naproxeno, por la presencia del Tween 80. Estos porcentajes confirman la alta velocidad del proceso, puesto que más del 50% de la degradación se alcanza en la mayor parte de los casos en tan solo 1 h de incubación. Asimismo, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la gran versatilidad del sistema, ya que los porcentajes de degradación finales superan el 80% sobre compuestos de una gran diversidad estructural.



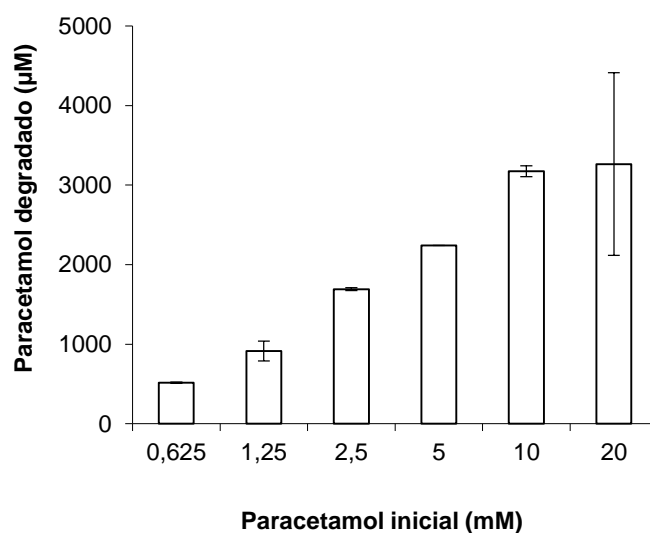
**Figura 3.74. Porcentajes de degradación de contaminantes emergentes obtenidos mediante la inducción de  $\cdot\text{OH}$  en *A. nidulans*.** Se muestran la degradación alcanzada tras 1 h y 6 h de incubación.

Finalmente se decidió estudiar si la concentración de contaminante podía influir en la eficiencia del proceso, aumentando con este propósito la concentración de contaminante empleada en los ensayos. Para ello se seleccionó al paracetamol como compuesto modelo dada su gran solubilidad. El rango de concentraciones utilizado estuvo comprendido entre 0,625 y 20 mM, manteniendo fija la concentración de 2,6-DBQ en 400  $\mu\text{M}$ . Durante el experimento se observó que al aumentar la concentración de paracetamol disminuía la velocidad de desaparición de 2,6-DBQ. Dicho fenómeno es claramente visible al representar las velocidades de degradación de ambos compuestos frente a la concentración de paracetamol (figura 3.75). De forma opuesta, la velocidad de degradación de paracetamol aumentó de forma lineal al emplear concentraciones crecientes del compuesto hasta una concentración de 2,5 mM, a partir de la cual parece que comienza a saturarse el sistema, alcanzándose en ese momento una velocidad de desaparición de paracetamol de 441  $\mu\text{M}/\text{h}$ . Este comportamiento puede ser debido a la baja especificidad y alta reactividad del  $\cdot\text{OH}$ , que por lo tanto tenderá a colisionar y reaccionar con aquellas moléculas que se encuentren en mayor proporción en la mezcla de incubación.



**Figura 3.75. Velocidades de degradación de paracetamol y 2,6-DBQ en función de la concentración inicial de paracetamol.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7, contenían 2,6-DBQ 400 μM, FeCl<sub>3</sub> 100 μM y EDTA 110 μM, 2,3 ± 0,2 mg/ml de micelio y las cantidades de paracetamol indicadas. Estas se llevaron a 37°C y 180rpm.

Como resultado de esa priorización en la degradación del paracetamol pudo observarse también un aumento de la concentración total degradada de éste, que una vez más fue proporcional a la concentración inicial hasta un valor de 2,5 mM, tal y como se muestra en la figura 3.76 al representar la cantidad de paracetamol degradada tras 8h de incubación. De dicha figura cabe resaltar que para las concentraciones de 10 y 20 mM la cantidad de paracetamol degradada fue ligeramente superior a 3 mM, lo que supone una gran eficiencia del sistema puesto que la cantidad de 2,6-DBQ empleada fue de 400 μM, es decir, por cada 1 μM de quinona se degradaron 7,5 μM de paracetamol.



**Figura 3.76. Cantidad de paracetamol degradado en función de la concentración inicial de este.** Las condiciones del experimento se detallan en la figura 3.77.

### 3.4. BIOOXIDACIÓN AVANZADA DE CONTAMINANTES EMERGENTES POR *P. oxalicum*

Para aplicar la capacidad de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  de *P. oxalicum* a la degradación de contaminantes emergentes, se escogieron el bisfenol A, carbamazepina, ciprofloxacino y diclofenaco.

Los ensayos para la degradación de dichos contaminantes se llevaron a cabo en dos condiciones de incubación: con micelio lavado en tampón y utilizando el propio cultivo. La obtención de buenos resultados realizando la incubación con la quinona y el hierro en el medio de cultivo permitiría simplificar la aplicación del proceso, así como un mejor mantenimiento del hongo en caso de necesitarse largos tiempos de incubación. La incubación en tampón se realizó empleando fosfato 20 mM, pH 7,0, al cual se añadió micelio lavado de 2 días de cultivo, una concentración de 100  $\mu\text{M}$  del contaminante y los elementos necesarios para la inducción de la producción de  $\cdot\text{OH}$  (2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$  y EDTA 110  $\mu\text{M}$ ). Por otra parte, la incubación en el medio de cultivo se realizó añadiendo directamente sobre un cultivo de 2 días el tampón fosfato, el contaminante y los componentes del ciclo redox de quinona, de tal forma que dicho medio quedó diluido finalmente a la mitad.

Los resultados obtenidos con el bisfenol A, carbamazepina y ciprofloxacino se muestran en la figura 3.77. No se presentan los resultados del diclofenaco pues este presentó una fuerte adsorción al micelio. En el caso del bisfenol A se observó la rápida degradación del compuesto, tanto en ausencia como presencia del medio de cultivo, si bien la velocidad de degradación fue mayor en ausencia del medio de cultivo, con un porcentaje de degradación a la hora del 69,2% frente al 23,1% observado en presencia del medio, posiblemente debido al secuestro de radicales  $\cdot\text{OH}$  por parte de los componentes de éste. Cabe destacar también de estos resultados, la alta capacidad de *P. oxalicum* para degradar el bisfenol A sin inducir la producción de  $\cdot\text{OH}$ , puesto que se obtuvo la degradación casi completa del compuesto a las 24h de incubación en los controles que carecían del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA.

La degradación de carbamazepina también se produjo tanto en tampón fosfato como con el medio de cultivo. De nuevo se observó mayor velocidad de degradación en las incubaciones realizadas en tampón, con un 85,8% de degradación tras 1h frente al 40,5% alcanzado en las incubaciones realizadas en el medio de cultivo. Tras 4h dichos porcentajes fueron del 98,0% y 73,7% en las incubaciones en ausencia y presencia de medio de cultivo, respectivamente. En los controles en los que no se indujo producción de  $\cdot\text{OH}$ , la carbamazepina no fue degradada.

En el caso del ciprofloxacino se alcanzó en las incubaciones con medio de cultivo el menor porcentaje de degradación, con un 19,0% tras 1h de tratamiento, mientras que la degradación fue del 73,1% para las incubaciones en tampón en el mismo periodo de tiempo. A las 4h de incubación dichos porcentajes incrementaron hasta un 48,8% y 93,1% con y sin medio respectivamente. El ciprofloxacino, al igual que la carbamazepina, no fue degradado directamente por el hongo.

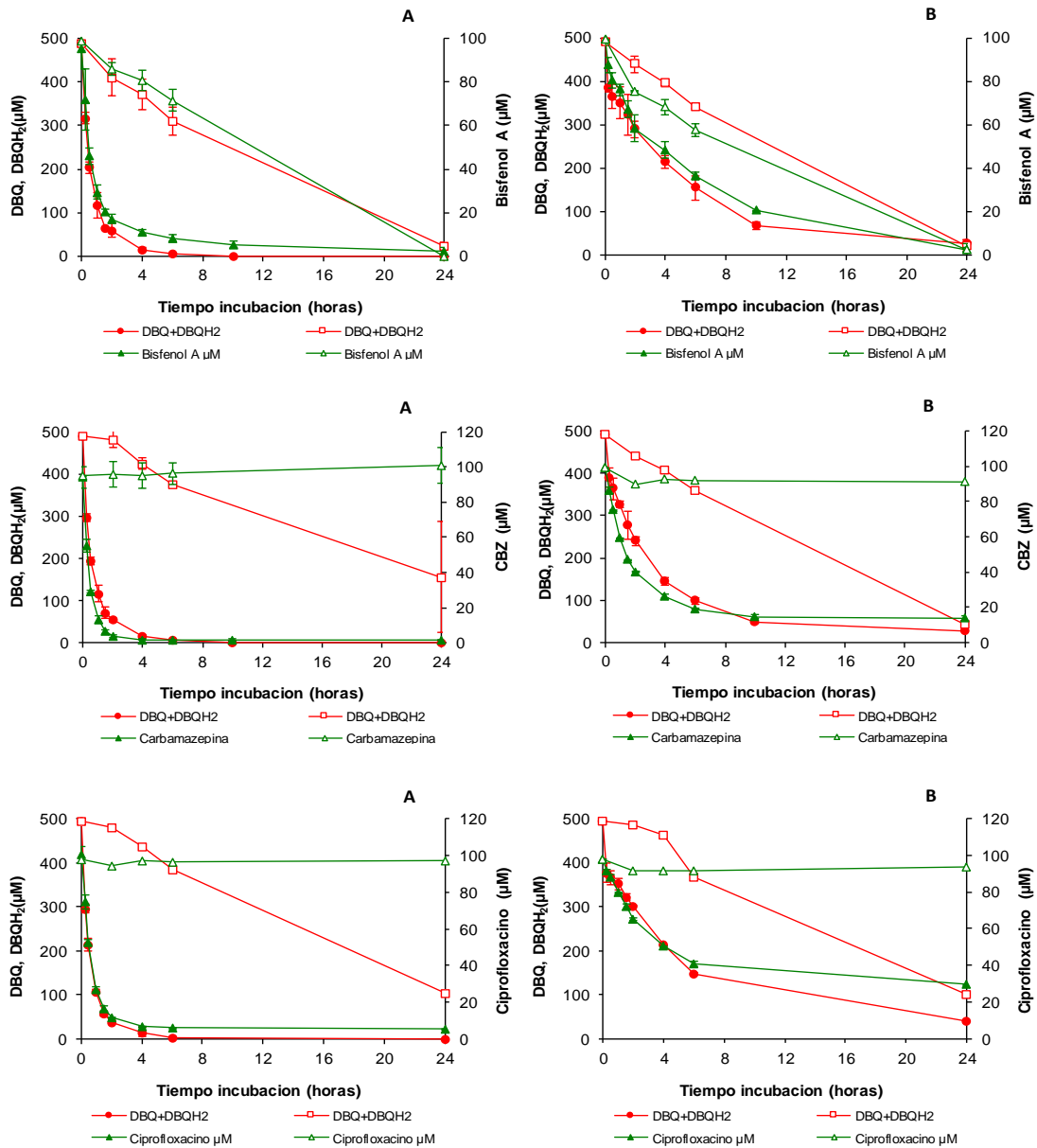
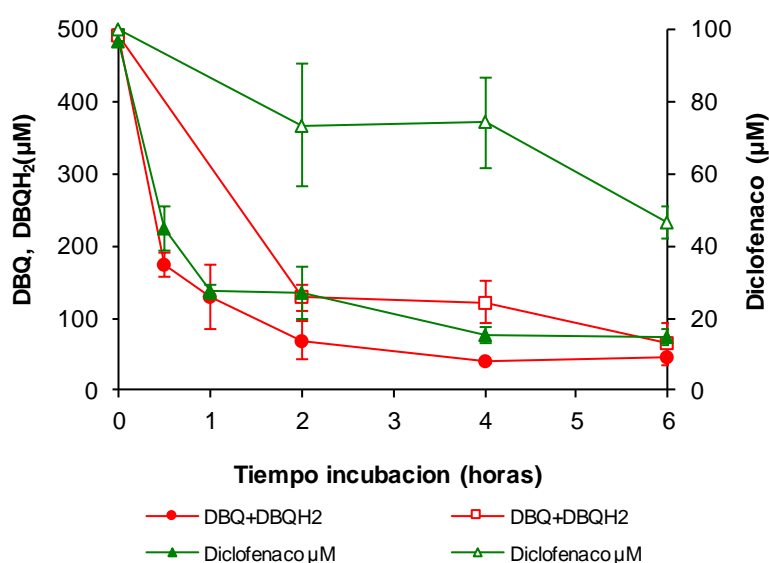


Figura 3.77. Biooxidación avanzada de bisfenol A, carbamezepina y ciprofloxacino por *P. oxalicum* en tampón fosfato (A) y medio de cultivo (B). Las incubaciones se llevaron a cabo con  $2,0 \pm 0,1$  mg/ml de micelio, a  $28^{\circ}\text{C}$  y 120rpm. Los símbolos rellenos representan los valores de las incubaciones completas y los símbolos vacíos los controles en ausencia del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA.

Estos resultados de degradación obtenidos en presencia del medio de cultivo suponen una alternativa interesante para la aplicación de este sistema puesto que, por una parte, supone una reducción en la complejidad técnica del proceso y, por otra, podría posibilitar tiempos de incubación mayores gracias al mejor mantenimiento del hongo. Dado que el hongo posee ya de por sí una alta capacidad degradativa esto resulta especialmente interesante puesto que podría continuar con la eliminación de los contaminantes de partida, o bien actuar sobre los intermediarios de degradación de los primeros. Ese mejor estado de conservación del hongo pudo constatarse en los experimentos al observar el peso seco del micelio de las distintas incubaciones, donde pudo apreciarse un mayor peso en aquellas incubaciones realizadas en el medio de cultivo sobre aquellas en tampón fosfato.

Sin embargo, las incubaciones realizadas en tampón fosfato suponen la alternativa óptima para obtener la rápida eliminación de los contaminantes ensayados. Por ello se realizaron en dichas condiciones los ensayos de degradación de diclofenaco, realizando a su vez un proceso de extracción para recuperar el compuesto adherido al micelio, cuyos resultados se muestran en la figura 3.78.

El primer resultado relevante obtenido en el experimento fue el correcto funcionamiento del sistema, pese a la adsorción al micelio del compuesto a degradar, con un porcentaje de degradación del 71,6% y 84,1% del diclofenaco inicial tras 1h y 4h de incubación, respectivamente. También se observó cierta capacidad del hongo para eliminar el diclofenaco en los controles en ausencia del complejo de hierro, con un porcentaje de degradación del 25,8% a las 4h de incubación, para llegar hasta el 41,5% a las 24h



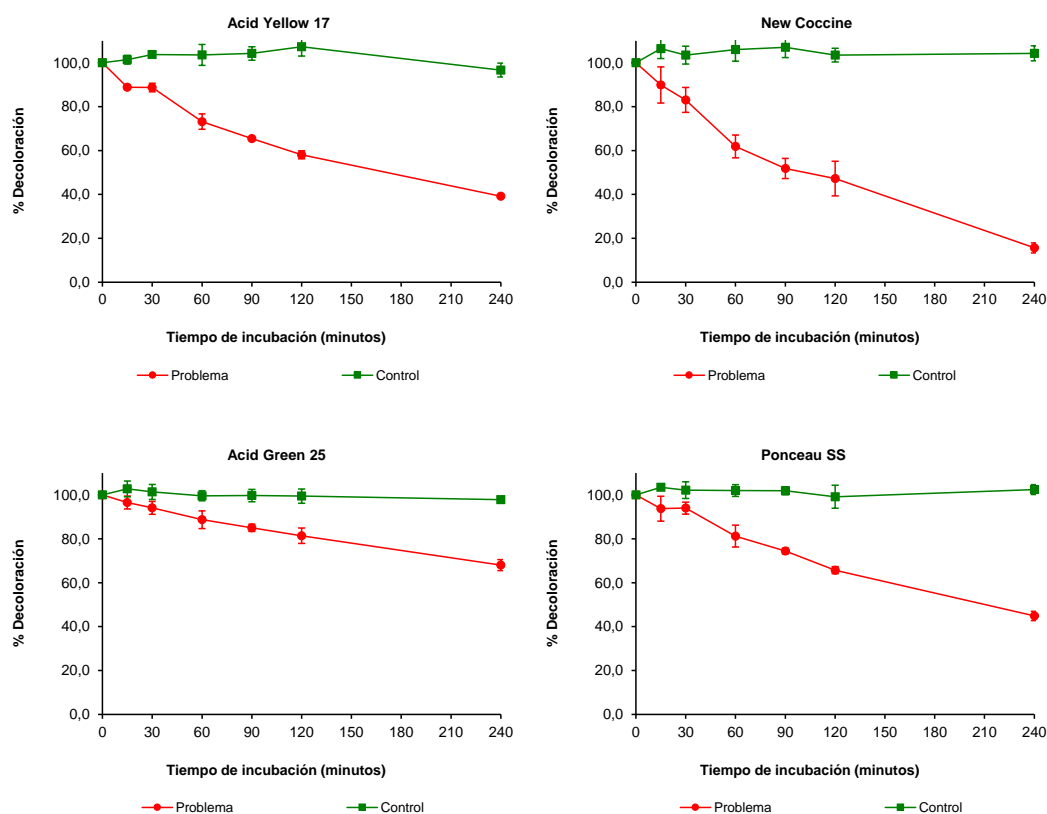
**Figura 3.78. Degradación de diclofenaco por *P. oxalicum* en tampón fosfato.** Las incubaciones se llevaron a cabo con  $3,0 \pm 0,1$  mg/ml de micelio, a  $28^{\circ}\text{C}$  y 120rpm. Los símbolos rellenos representan los valores de las incubaciones completas y los símbolos vacíos los controles en ausencia del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA. La extracción de los compuestos se realizó con 1,6ml de etanol por cada 1 ml de mezcla de incubación.

### 3.5. BIOOXIDACIÓN AVANZADA DE COLORANTES Y FÁRMACOS POR *Escherichia coli*

#### 3.5.1. Colorantes

Los primeros ensayos de degradación empleando el sistema de producción de radicales ·OH en *E. coli* se llevaron a cabo con colorantes textiles. La degradación de colorantes tipo azo por *E. coli* ha sido descrita en condiciones anaerobias (Liu et al., 2009), en las cuales se produce la generación de aminas aromáticas, potencialmente carcinógenas, por lo que la posibilidad de llevar a cabo un tratamiento aeróbico resultaría una alternativa interesante a dichas aplicaciones.

Para el experimento se escogieron 4 colorantes, dos de tipo azo, Acid Yellow 17 y New Coccine, uno de tipo diazo, Ponceau SS y uno de tipo antraquinona, Acid Green 25. Los resultados de la figura 3.79 muestran como todos los colorantes fueron decolorados, al menos parcialmente, en condiciones de producción de radicales ·OH, mientras que los controles indicaron que la bacteria no era capaz de decolorar los compuestos ensayados por sí misma. Los mayores porcentajes de decoloración se alcanzaron con los colorantes de tipo azo, con un 26,8 y 38,1 % de decoloración tras 1 h de incubación para el Acid Yellow 17 y New Coccine, respectivamente. En el caso del New Coccine dicho porcentaje llegó a alcanzar el 84,4 % tras 4 h de incubación. El porcentaje de decoloración del Ponceau SS tras 1h fue del 18,7 %, llegándose a alcanzar un 55,1 % a las 4h. El Acid Green 25 resultó el más recalcitrante de los compuestos ensayados, con porcentajes de decoloración del 11,3 y 31,9 % tras 1 y 4 h de incubación respectivamente.

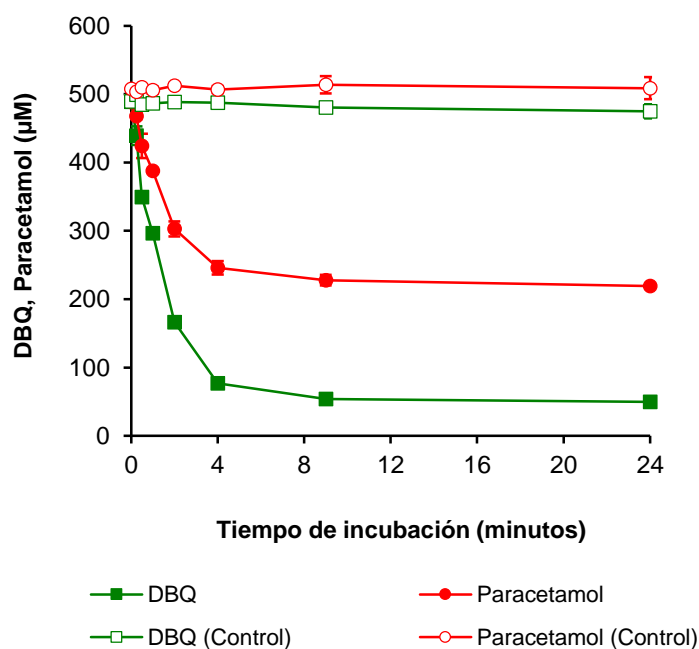


**Figura 3.79. Biooxidación avanzada de colorantes por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500 μM, FeCl<sub>3</sub> 100 μM, EDTA 110μM, cada uno de los colorantes 50 μM y la concentración de bacterias correspondiente a un cultivo de 24 h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37 °C y 180rpm. Los controles carecían del complejo Fe<sup>3+</sup> - EDTA.

**3.5.2. Fármacos**

Para evaluar la capacidad del sistema de producción de radicales ·OH sobre contaminantes emergentes de las aguas se seleccionaron como modelos el paracetamol, antipirético de uso común, y el ciprofloxacino, quinolona de segunda generación.

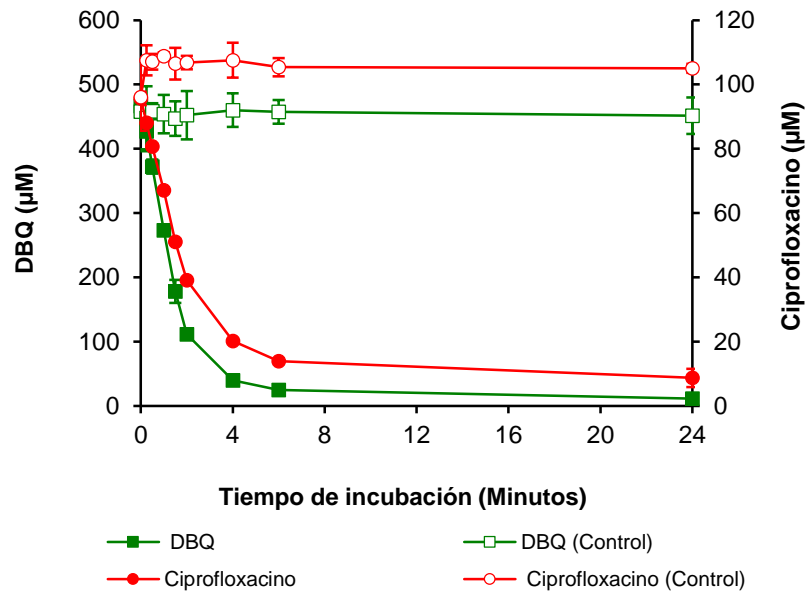
La degradación del paracetamol (figura 3.80) ocurrió únicamente en las incubaciones con todos los componentes necesarios para la producción de radicales ·OH, mientras que este quedó inalterado en las incubaciones carentes de hierro. Dicha degradación alcanzó porcentajes del 20,6 y 49,7 % tras 1 y 4 horas de incubación, respectivamente. Tras 4 h de incubación la degradación del paracetamol se detuvo, al igual que la degradación de la 2,6-DBQ, posiblemente debido a la baja concentración de la quinona, o bien al agotamiento del poder reductor de la bacteria.



**Figura 3.80. Biooxidación avanzada de paracetamol por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500 μM, FeCl<sub>3</sub> 100 μM, EDTA 110μM, paracetamol 500 μM y la concentración de bacterias correspondiente a un cultivo de 24 h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37 °C y 180rpm. Los controles carecían del complejo Fe<sup>3+</sup> - EDTA.

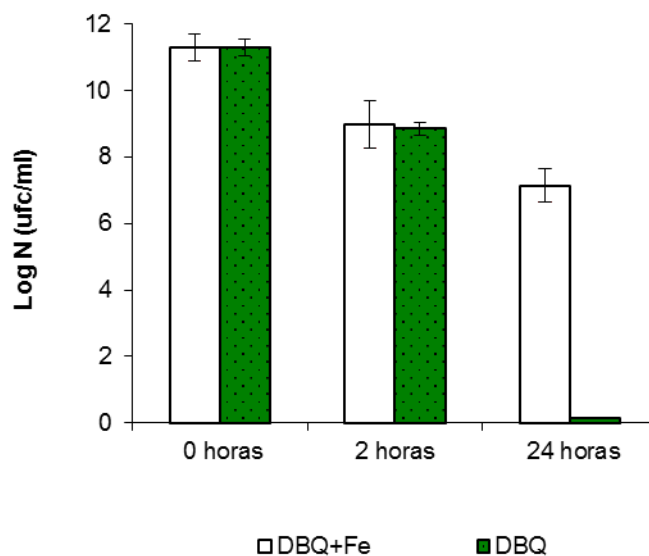
En el caso del ciprofloxacino (figura 3.81), el comportamiento fue similar al observado para el paracetamol. La degradación ocurrió mayoritariamente en las primeras 4 h de incubación y únicamente en condiciones de producción de radicales ·OH. Sin embargo, dicha degradación alcanzó porcentajes superiores a los alcanzados con el paracetamol (30 y 70 % tras 1 y 4 h) y continuó ligeramente hasta las 24 h, donde se llegó alcanzar un porcentaje de degradación del 90,9 %.





**Figura 3.81. Biooxidación avanzada de ciprofloxacino por *E. coli*.** Las incubaciones contenían tampón fosfato 20mM pH 7, 2,6-DBQ 500 μM, FeCl<sub>3</sub> 100 μM, EDTA 110μM, ciprofloxacino 500 μM y la concentración de bacterias correspondiente a un cultivo de 24 h en 40 ml de caldo LB. La incubación se realizó a 37 °C y 180rpm. Los controles carecían del complejo Fe<sup>3+</sup> - EDTA.

Especialmente sorprendente fue el resultado de los recuentos de células viables llevados a cabo durante el experimento a las 0, 4 y 24 h (figura 3.82), que mostraron que el antibiótico destruyó todas las células de la población en los controles, mientras que la inducción de la producción de radicales ·OH no solo posibilitó la degradación del antibiótico por *E. coli* sino que, además, y gracias a ello, la mayor parte de las células de la población siguieron viviendo.



**Figura 3.82. Población de *E. coli* durante las incubaciones con ciprofloxacino cuyos resultados se muestran en la figura 3.81**

### 3.6. REUTILIZACIÓN DEL HONGO EN TANDAS SUCESIVAS DE OXIDACIÓN AVANZADA

Tras haber comprobado la posibilidad de inducir la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en numerosos microorganismos, y que dicha inducción aumenta significativamente la capacidad degradativa de los mismos frente a una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentran colorantes textiles, fármacos y disruptores endocrinos, se decidió estudiar a continuación la posibilidad de emplear dicho sistema en tandas sucesivas de degradación. Los hongos que se utilizaron en este estudio fueron *T. versicolor* y *A. nidulans*.

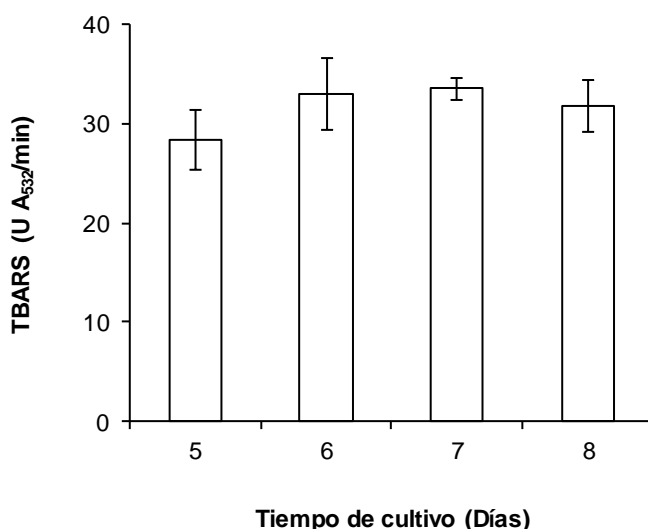
#### 3.6.1. *Trametes versicolor*

En primer lugar, se empleó un hongo basidiomiceto de podredumbre blanca para realizar las tandas de reutilización de micelio, puesto que dichos microorganismos producen un gran cantidad de radicales en el proceso de descomposición de la madera (fruto de la acción de las enzimas ligninolíticas) y, por lo tanto, habrán desarrollado mecanismos que les protejan de los efectos nocivos de los mismos, lo que a priori se consideró que aumentaría las posibilidades de éxito de este estudio.

##### 3.6.1.1. Tiempo de cultivo y cantidad óptima de micelio para la producción de $\cdot\text{OH}$ .

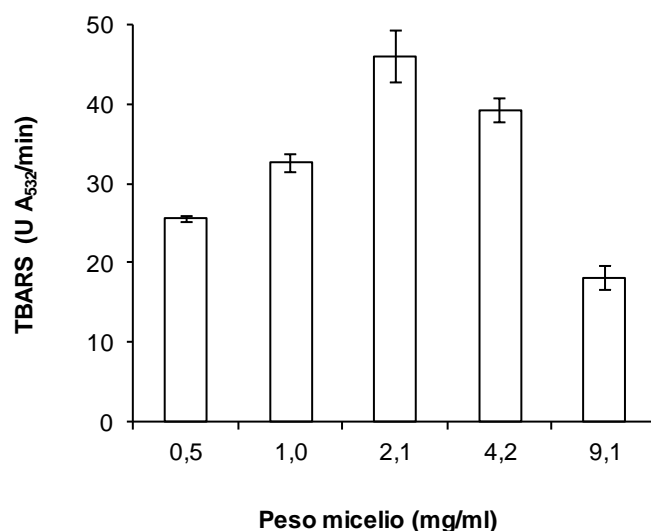
En primer lugar se optimizó la producción de  $\cdot\text{OH}$  en función de la cantidad de micelio y el tiempo de cultivo. Para valorar el efecto de la edad de cultivo sobre la producción de  $\cdot\text{OH}$  se empleó micelio de 5 a 8 días de cultivo. Se mantuvieron las condiciones de cultivo empleadas por Aranda et al., 2010, en cuyo trabajo se describe que el peso máximo se alcanza en los días 5 y 6 de cultivo. Además, se realizaron las incubaciones en condiciones óptimas de producción de  $\cdot\text{OH}$  descritas por estos autores, es decir, con 2,6-DBQ, el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalato y  $\text{Mn}^{2+}$ , en tampón fosfato a pH 5.

Los resultados del experimento no mostraron diferencias significativas entre las distintas edades de cultivo en la velocidad de producción de TBARS (figura 3.83), lo que ofrecía gran flexibilidad a la hora de elegir la edad de cultivo para realizar los experimentos.



**Figura 3.83. Efecto de la edad de cultivo sobre la velocidad de producción de  $\cdot\text{OH}$ .** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Mn}^{2+}\text{SO}_4$  100  $\mu\text{M}$  y micelio lavado de distintas edades de cultivo. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

Para estudiar el efecto de la cantidad de biomasa sobre la producción de  $\cdot\text{OH}$ , se realizaron incubaciones con micelio de 5 días manteniendo la proporción con el cultivo, doblándola y reduciéndola en proporción 1:2, 1:4 y 1:8. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.84. La velocidad de producción de TBARS aumentó conforme lo hizo la cantidad de micelio empleada en las incubaciones hasta alcanzar un valor máximo de  $46,0 \pm 3,3$  mU  $A_{532}/\text{min}$  con 2,1 mg/ml de micelio. Incrementos posteriores de la cantidad de micelio repercutieron negativamente sobre la velocidad de producción de TBARS, posiblemente debido a que la actividad QR deja de limitar la velocidad del ciclo, y se ponen de manifiesto otros efectos de la biomasa como el posible secuestro de radicales  $\cdot\text{OH}$ . De estos resultados se deduce por lo tanto que realizar incubaciones con cantidades cercanas a 2mg/ml de micelio resultaría idóneo para la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en futuros experimentos.

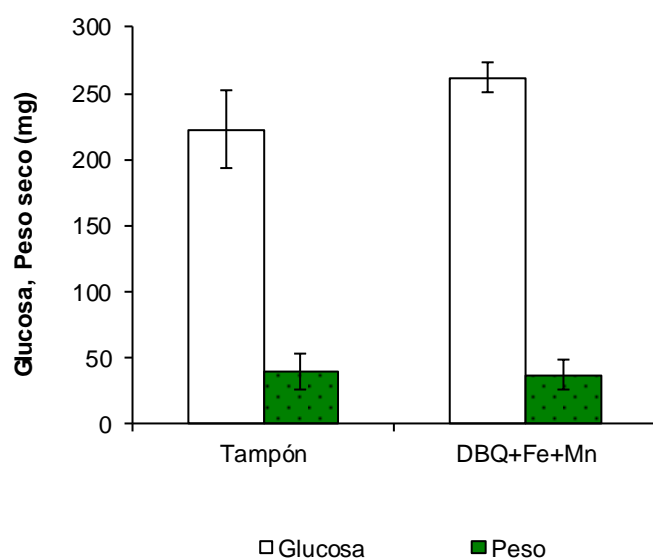


**Figura 3.84. Efecto de la cantidad de micelio sobre la velocidad de producción de  $\cdot\text{OH}$ .** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Mn}^{2+}\text{SO}_4$  100  $\mu\text{M}$  y micelio lavado en distintas proporciones respecto al cultivo. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

### 3.6.1.2. Efectos de los ciclos redox de quinona en la viabilidad de *T. versicolor*

Antes de realizar los experimentos de reutilización de micelio, se valoraron los efectos del ciclo redox de quinona sobre el hongo, en base a dos factores: incremento de peso y consumo de glucosa.

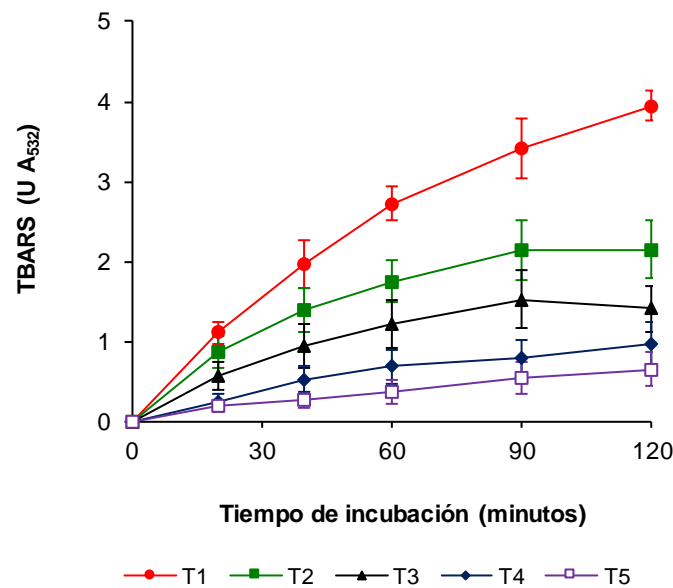
El experimento consistió en el cultivo durante 24h en medio Czapek-Dox de micelio de 5 días que había sido sometido a la ciclos redox de 2,6-DBQ, o mantenido en tampón fosfato en el caso de los controles, durante 4h, para a continuación determinar el incremento de peso y consumo de glucosa en ambos casos. En base a los resultados del experimento (figura 3.85) se puede afirmar que la inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$  no produjo efectos adversos sobre el micelio de *T. versicolor*, puesto que no hubo diferencias significativas en cuanto al incremento de peso o consumo de glucosa frente al micelio que no fue sometido a la inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$ .



**Figura 3.85. Efecto de los ciclos redox de la 2,6-DBQ sobre la viabilidad de *T. versicolor*.** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y, salvo en los controles, contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu$ M, ácido oxálico 300  $\mu$ M,  $\text{Mn}^{2+}\text{SO}_4$  100  $\mu$ M y  $2,0 \pm 0,3$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm. El cultivo del micelio se realizó en matraces de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio malta. Los valores mostrados son la media de tres cultivos así como su desviación estándar.

### 3.6.1.3. Reutilización del micelio en tandas sucesivas de producción de radicales $\cdot\text{OH}$

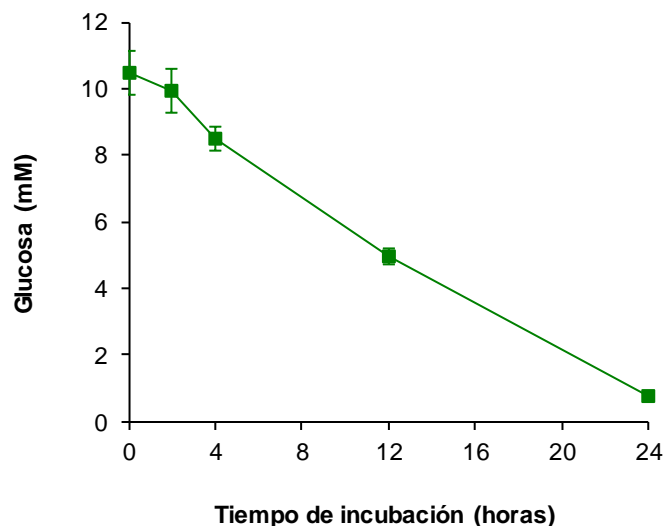
Puesto que una tanda de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  no tenía efectos adversos sobre el micelio, el siguiente paso consistió en averiguar si se podían llevar varias tandas de inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$  manteniéndose la eficacia del proceso. El ensayo realizado con dicho objetivo consistió en llevar a cabo una tanda de inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$  diaria durante 5 días consecutivos, lavando el micelio con agua destilada antes del comienzo de cada tanda, a fin de evitar que los productos de las tandas anteriores interfiriesen en la valoración de la producción de TBARS de cada tanda, y manteniendo condiciones asépticas durante todo el proceso. Los resultados obtenidos de la valoración de TBARS durante las 2 primeras horas de cada tanda (figura 3.86) mostraron un descenso en la eficacia de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  de forma sucesiva en cada día de reutilización del micelio. Las velocidades de producción de TBARS de la tanda 1 (T1) a la 5 (T5), calculadas entre los 20 y 60 minutos de incubación, fueron  $40,5 \pm 2,3$ ,  $22,0 \pm 2,0$ ,  $16,5 \pm 3,3$ ,  $10,9 \pm 2,8$  y  $4,5 \pm 1,9$  mU  $A_{532}/\text{min}$ . El análisis del peso del micelio al final del experimento mostró que se había sufrido una pérdida significativa de biomasa desde el principio del experimento ( $2,2 \pm 0,2$  mg/ml) hasta el final del mismo ( $0,8 \pm 0,1$  mg/ml).



**Figura 3.86. Producción de TBARS por *T. versicolor* en tandas diarias sucesivas.** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu$ M, ácido oxálico 300  $\mu$ M,  $\text{Mn}^{2+}\text{SO}_4$  100  $\mu$ M, desoxirribosa 2,8 mM y  $2,2 \pm 0,2$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

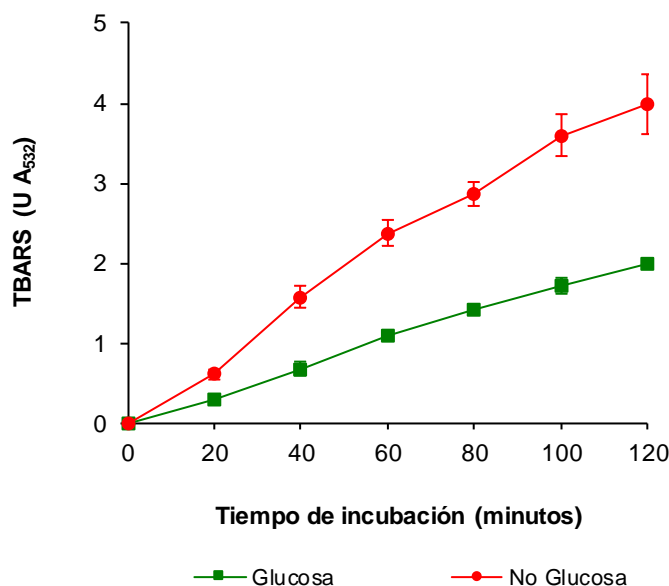
La explicación más probable para estos resultados sería que al incubarse el hongo durante varios días este agote sus reservas energéticas y entre en fase de autólisis, a diferencia de lo que ocurre en los ensayos realizados hasta ahora, donde la inducción del ciclo redox de quinonas se lleva a cabo en tiempos cortos de incubación, puesto que la quinona se consume rápidamente en el proceso.

En base a dicho razonamiento se decidió realizar nuevamente el experimento, suministrando glucosa al hongo como fuente de energía. Para ello hubo que determinar previamente la concentración de glucosa que consumiría el micelio de 5 días en cada tanda de 24 horas. Según muestran los resultados de la figura 3.87, dicha concentración fue de  $8,2 \pm 0,9$  mM, por lo que se decidió emplear 10 mM de glucosa/tanda.



**Figura 3.87. Consumo de glucosa por *T. versicolor*.** Las incubaciones realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían glucosa 10 mM y  $2,1 \pm 0,3$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

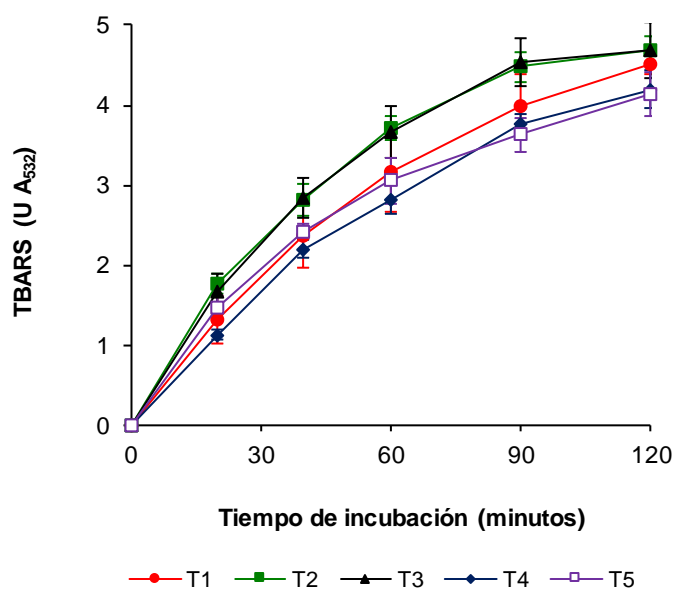
Sin embargo, tal y como se ha comprobado en otras ocasiones, la adición de glucosa u otras sustancias a la mezcla de incubación podría suponer una reducción de la eficacia del proceso, debido al secuestro de  $\cdot\text{OH}$  por las mismas. Para calcular el impacto que supondría incluir la concentración de glucosa necesaria para el mantenimiento del hongo, se realizó un experimento de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  valorándose la producción de TBARS en ausencia y presencia de 10mM de glucosa (figura 3.88). La velocidad de producción de TBARS en presencia de glucosa 10mM se redujo un 50%, siendo de  $18,2 \pm 0,7$  mU  $A_{532}/\text{min}$ , frente a la alcanzada en ausencia de glucosa de  $40,4 \pm 2,7$  mU  $A_{532}/\text{min}$ .



**Figura 3.88. Efecto de la presencia glucosa 10mM sobre la producción de TBARS por *T. versicolor*.** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Mn}^{2+}\text{SO}_4$  100  $\mu\text{M}$ , desoxirribosa 2,8 mM,  $2,6 \pm 0,3$  mg/ml de micelio y glucosa 10 mM en el caso que se indica. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

En base a estos resultados se decidió evitar superponer la adición de glucosa con la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ , añadiéndola una vez transcurridas 4h desde el inicio de la producción de los radicales en cada tanda, momento en el cual dicha producción habría cesado.

Empleando esas nuevas condiciones de trabajo se repitieron las tandas de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  durante 5 días consecutivos, sin observarse en esta ocasión (figura 3.89) un descenso de la producción de TBARS entre cada tanda, tal y como había ocurrido en ausencia de glucosa (figura 3.86). Las velocidades de producción de TBARS de la tanda 1 a la 5 fueron:  $48,5 \pm 5,4$ ,  $48,5 \pm 1,3$ ,  $50,1 \pm 2,7$ ,  $42,3 \pm 4,5$  y  $40,2 \pm 2,9$  mU  $A_{532}$ /min. Es decir, solo se observó un ligero descenso en la velocidad de producción de TBARS a partir de la cuarta tanda de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ . En cuanto al peso del micelio, no se produjo un descenso, a diferencia del experimento en ausencia de glucosa, sino que incluso aumento ligeramente desde  $1,6 \pm 0,3$  al inicio del experimento, hasta  $2,3 \pm 0,2$  al finalizar la quinta tanda.



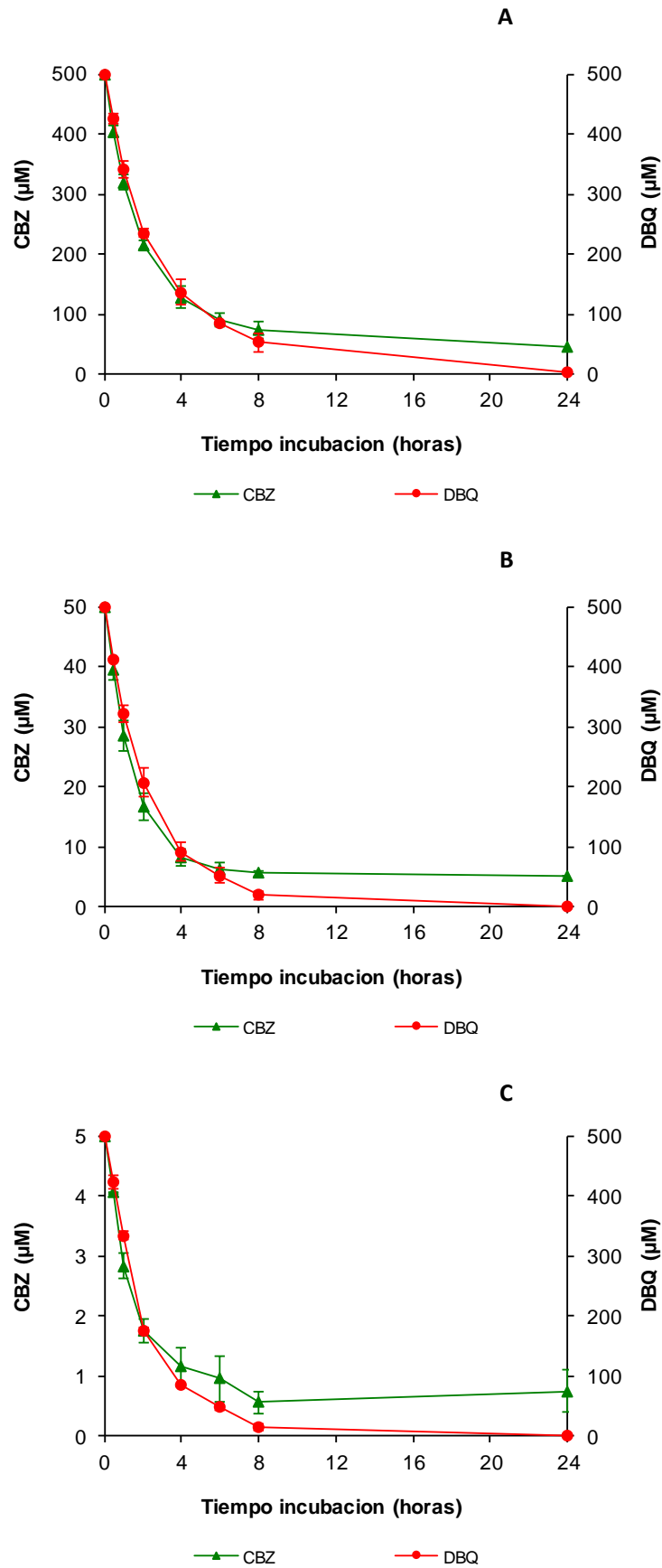
**Figura 3.89.** Producción de TBARS por *T. versicolor* en tandas diarias sucesivas. Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , ácido oxálico 300  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Mn}^{2+}\text{SO}_4$  100  $\mu\text{M}$ , desoxirribosa 2,8 mM y  $1,6 \pm 0,3$  mg/ml de micelio. Glucosa 10mM fue añadida a las 4h del inicio de cada tanda. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm. Los valores mostrados son la media de tres cultivos así como su desviación estándar.

#### 3.6.1.4. Degradación de carbamazepina en tandas sucesivas de oxidación avanzada

Para poder llevar a cabo la degradación de carbamazepina en tandas sucesivas de degradación se calculó en primer lugar la concentración más adecuada para el ensayo, mediante un experimento de oxidación avanzada con concentraciones de 5, 50 y 500 $\mu\text{M}$  de carbamazepina. Para las tres concentraciones ensayadas se observó (figura 3.90) la degradación rápida y de forma lineal del compuesto durante las 2 primeras horas del ensayo. A continuación, la velocidad de degradación fue disminuyendo paulatinamente hasta las 6 h, alcanzándose porcentajes de degradación en todos los casos superiores al 80%. Este perfil se correlaciona con el observado para la 2,6-DBQ, que también es oxidada por los  $\cdot\text{OH}$ . Sin embargo, a diferencia de la carbamazepina, la quinona continuó siendo degradada hasta desaparecer entre las 8 y 24 h de incubación.

Analizando los resultados en función de la concentración de carbamazepina, se observa que la eficacia del proceso, expresada en términos de velocidad y cantidad de fármaco degradado, es directamente proporcional a este parámetro. Así, la velocidad calculada con los datos del periodo 0-2 horas de las incubaciones que contenían 5, 50 y 500  $\mu\text{M}$  fueron respectivamente 1,6, 16,5 y 148,7  $\mu\text{M}/\text{h}$ . La concentración degradada en las mismas incubaciones fue respectivamente 2,8, 27,8 y 215,8  $\mu\text{M}$ , lo que supone aproximadamente un 50% en los tres casos. De estos resultados se puede deducir que hasta 500  $\mu\text{M}$  de carbamazepina la cantidad de  $\cdot\text{OH}$  producido no es un factor que limite el proceso de biooxidación avanzada de carbamazepina y que la eficacia del mismo podría aumentar con concentraciones superiores del fármaco.



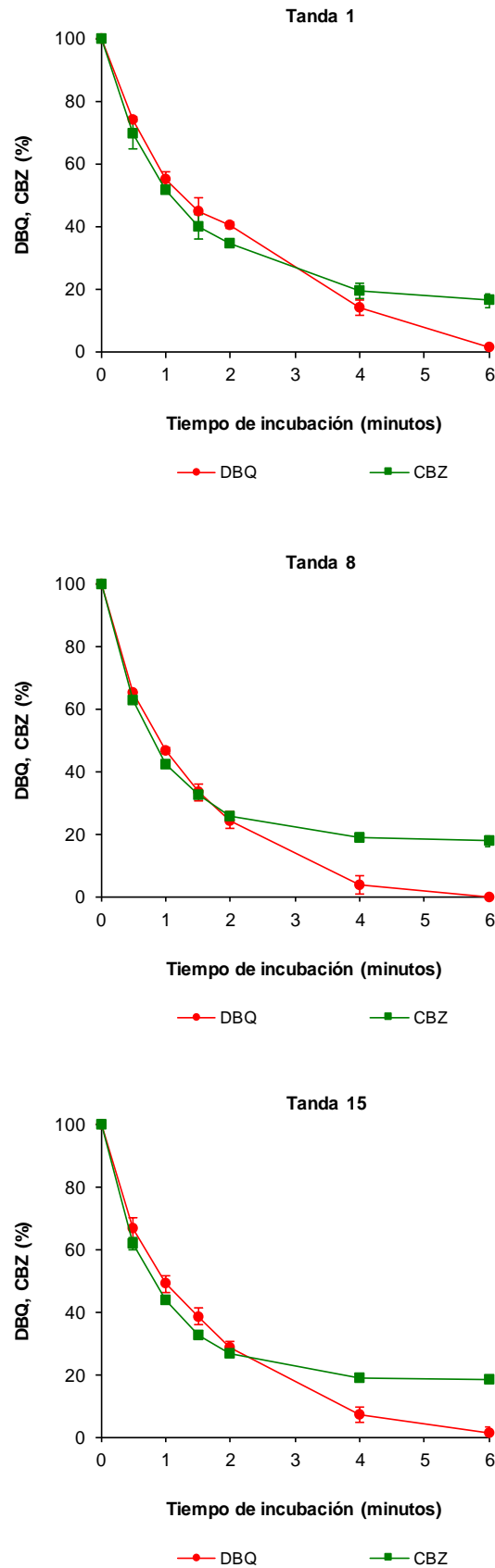


**Figura 3.90. Biooxidación avanzada de distintas concentraciones de carbamazepina por *T. versicolor*.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500 μM, Fe<sup>3+</sup> 100 μM, ácido oxálico 300 μM, Mn<sup>2+</sup>SO<sub>4</sub> 100 μM, 1,9 ± 0,1 mg/ml de micelio y carbamazepina 5, 50 o 500 μM según se indique. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

Para realizar las tandas de oxidación avanzada de carbamazepina se empleó una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y las condiciones determinadas en el apartado anterior (fig. 3.89) para el ensayo de producción de TBARS, salvo que en esta ocasión la glucosa fue añadida a las 6h de incubación, puesto que tal y como se observó en el ensayo anterior (figura 3.90), la degradación de la carbamazepina se detenía en ese momento. El número de tandas realizadas fue de 15, a lo largo de 18 días, que se distribuyeron en 3 grupos de 5 días consecutivos, dejando pasar un día entre el primer y segundo grupo, y dos días entre el segundo y el tercer grupo. La concentración de glucosa añadida entre estos grupos fue respectivamente de 20 y 30 mM.

Los resultados obtenidos fueron muy similares a los mostrados en el experimento anterior (figura 3.90), no observándose prácticamente diferencias en ninguna de las tandas. Para ilustrarlo, en la figura 3.91 se muestra la evolución durante 6 horas de la concentración de CBZ y DBQ de las tandas 1, 8 y 15. Únicamente la primera tanda presentó un ligero retraso en la degradación de ambos compuestos, probablemente debido a la adaptación del hongo a las condiciones de incubación. En la figura 3.92 se presentan los porcentajes de degradación de las 15 tandas, alcanzados tras 1 y 6 horas de incubación. Como puede observarse, en ningún caso se observaron diferencias significativas entre las tandas. Transcurrida la primera hora, el porcentaje medio de degradación de CBZ y DBQ fue de  $55,8 \pm 4,4$  y  $50,7 \pm 4,2$  respectivamente. A las 6 horas, la degradación de la CBZ aumentó hasta un  $84,2 \pm 1,6\%$  y la DBQ se había degradado casi en su totalidad ( $99,9 \pm 0,5\%$ ). Por último, cabe mencionar que el peso del hongo a lo largo de los días se mantuvo prácticamente sin cambios, ya que de los  $2,3 \pm 0,0$  mg/ml con los que se inició el experimento se pasó a  $2,0 \pm 0,1$  mg/ml al final del mismo.

Estos resultados son de gran interés ya que suponen la primera demostración de la posibilidad de reutilizar un hongo durante un periodo largo de tiempo para la oxidación avanzada de contaminantes, sin que se vea afectada su viabilidad y la eficacia de proceso.



**Figura 3.91. Biooxidación avanzada de carbamazepina por *T. versicolor* en tandas sucesivas de oxidación avanzada.** Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M,  $Fe^{3+}$  100  $\mu$ M, ácido oxálico 300  $\mu$ M,  $Mn^{2+}SO_4$  100  $\mu$ M, carbamazepina 50  $\mu$ M y  $2,3 \pm 0,0$  mg/ml de micelio. Glucosa 10 mM fue añadida a las 6 h del comienzo de cada tanda. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

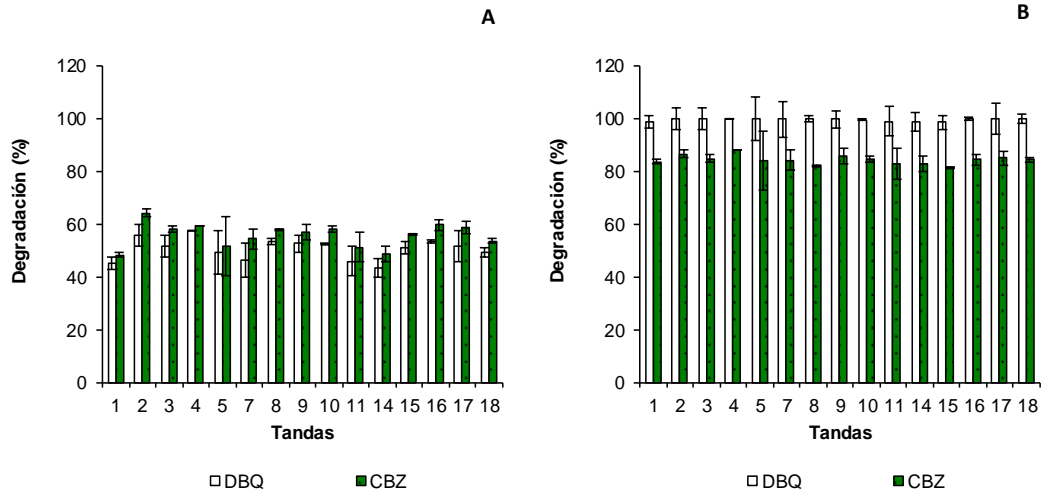


Figura 3.92. Porcentajes de degradación de carbamazepina por *T. versicolor* en tandas sucesivas de oxidación avanzada. Se muestran los porcentajes de degradación obtenidos tras 1 h (A) y 6 h (B) de incubación.

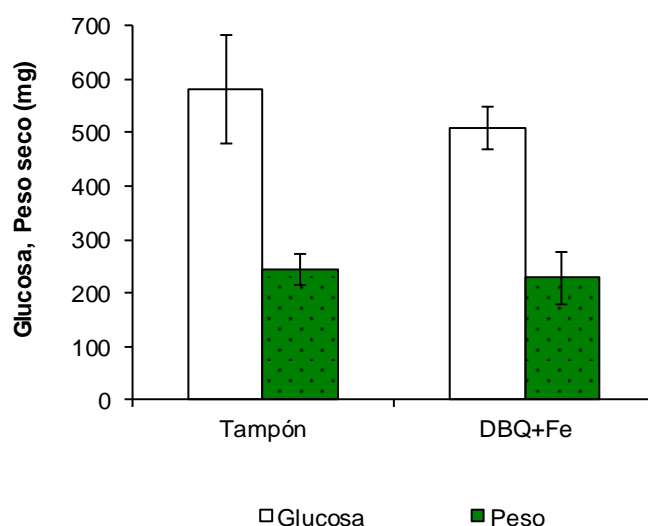
### 3.6.2. *Aspergillus nidulans*

Una vez demostrada la posibilidad de reutilizar el micelio de *T. versicolor* en tandas sucesivas de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  se planteó la posibilidad de replicar dichos resultados, en esta ocasión, empleando un hongo ascomiceto, *A. nidulans*, del que se pensaba a priori que estaría menos adaptado a la presencia y/o producción de radicales.

#### 3.6.2.1. Efectos de los ciclos redox de quinona en la viabilidad de *A. nidulans*.

En primer lugar se estudió el efecto de la inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$  sobre el micelio en base a dos factores: incremento de peso y consumo de glucosa.

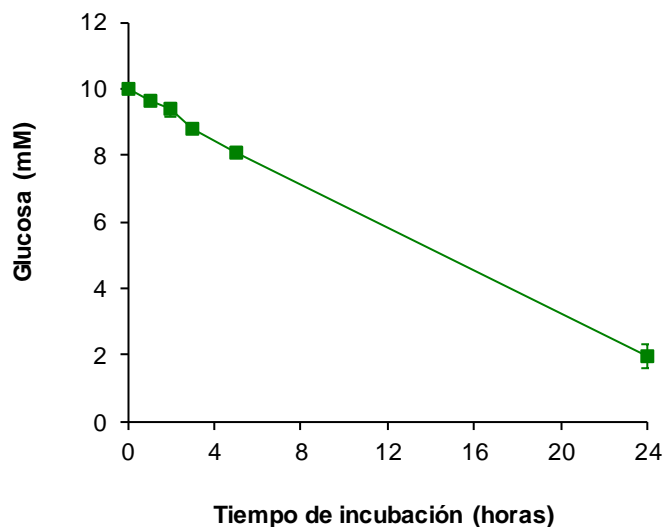
En el experimento, micelio de 3 días fue incubado en condiciones de inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$ , o bien en tampón fosfato en el caso de los controles, durante 4h. Dicho micelio fue cultivado posteriormente durante 24h en el medio definido utilizado para su crecimiento, a fin de determinar el incremento de peso y consumo de glucosa que se había producido en ambos casos. Los resultados del experimento (figura 3.93) no mostraron diferencias significativas entre las incubaciones control y las de producción de  $\cdot\text{OH}$  para los parámetros ensayados. Por lo tanto, se dedujo que la inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$  no tiene efectos adversos sobre el micelio de *A. nidulans*, al menos en incubaciones de 4h.



**Figura 3.93. Efecto de los ciclos redox de la 2,6-DBQ sobre la viabilidad de *A. nidulans*.** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y, salvo en los controles, contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$  y  $2,5 \pm 0,3$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40ml de mezcla de incubación a 37°C y 180rpm. El cultivo del micelio se realizó en matraces de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio definido.

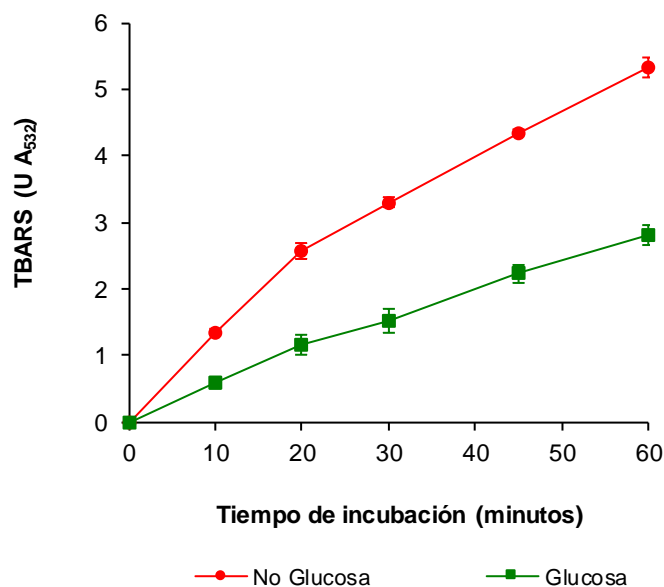
#### 3.6.2.2. Reutilización del micelio en tandas sucesivas de producción de radicales $\cdot\text{OH}$

El estudio realizado con *T. versicolor* (apartado 3.6.1.3), mostró que pese a la ausencia de efectos adversos de la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  sobre el micelio, era necesaria la adición de glucosa para mantener el metabolismo energético del hongo y la eficiencia del proceso al realizar ciclos redox 2,6-DBQ durante tandas sucesivas. Por ello, se determinó la concentración de glucosa consumida por el hongo en 24h, mediante incubaciones de este en presencia de glucosa (figura 3.94), a fin de suministrar posteriormente dicha concentración en cada tanda. El consumo resultó ser de  $8,0 \pm 0,4$  mM y, por ello, se añadieron 10 mM de glucosa en las tandas de inducción de radicales  $\cdot\text{OH}$ .



**Figura 3.94. Consumo de glucosa por *A. nidulans*.** Las incubaciones realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían glucosa 10 mM y  $2,0 \pm 0,1$  mg/ml de micelio. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 37°C y 180rpm.

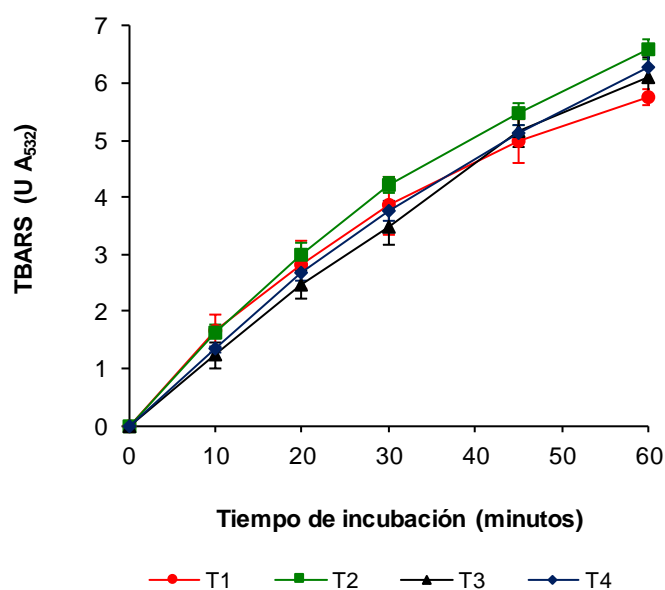
Un ensayo de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en presencia de glucosa 10 mM (figura 3.95) mostró que este compuesto secuestraba gran parte de la producción de los radicales, reduciéndose la velocidad de producción de TBARS de  $86,1 \pm 1,6$  mU  $A_{532}$ /min en ausencia de glucosa a  $46,2 \pm 1,9$  mU  $A_{532}$ /min en presencia de ésta, lo que supone una reducción del 46,3 %, resultado que se encuentra en consonancia con el obtenido con *T. versicolor* (figura 3.88).



**Figura 3.95. Efecto en la producción de TBARS por *T. versicolor* de la presencia de glucosa 10mM.** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$ , desoxirribosa 2,8 mM,  $2,5 \pm 0,4$  mg/ml de micelio y glucosa 10 mM en el caso que se indica. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 37°C y 180rpm.

Por ello se decidió continuar con la estrategia empleada con *T. versicolor* y añadir la glucosa una vez terminada la producción de  $\cdot\text{OH}$ .

Una vez determinada la cantidad de glucosa y el momento más adecuado para añadirla a la mezcla de incubación (4 horas) se llevaron a cabo tandas de producción de  $\cdot\text{OH}$  durante 4 días consecutivos, cuyos resultados se muestran en la figura 3.96. Como puede observarse, la producción de TBARS se mantuvo constante a lo largo de las tandas, con velocidades de producción de TBARS desde la tanda 1 a la 4 de  $94,8 \pm 2,6$ ,  $109,0 \pm 2,8$ ,  $111,7 \pm 5,4$  y  $107,3 \pm 3,1$  mU  $A_{532}$ /min. Estos resultados demostraban, por tanto, que también es posible la reutilización del micelio de un hongo ascomiceto en tandas sucesivas de producción de  $\cdot\text{OH}$ , sin que el proceso pierda eficacia, siendo necesaria únicamente la adición de glucosa para el mantenimiento del micelio.

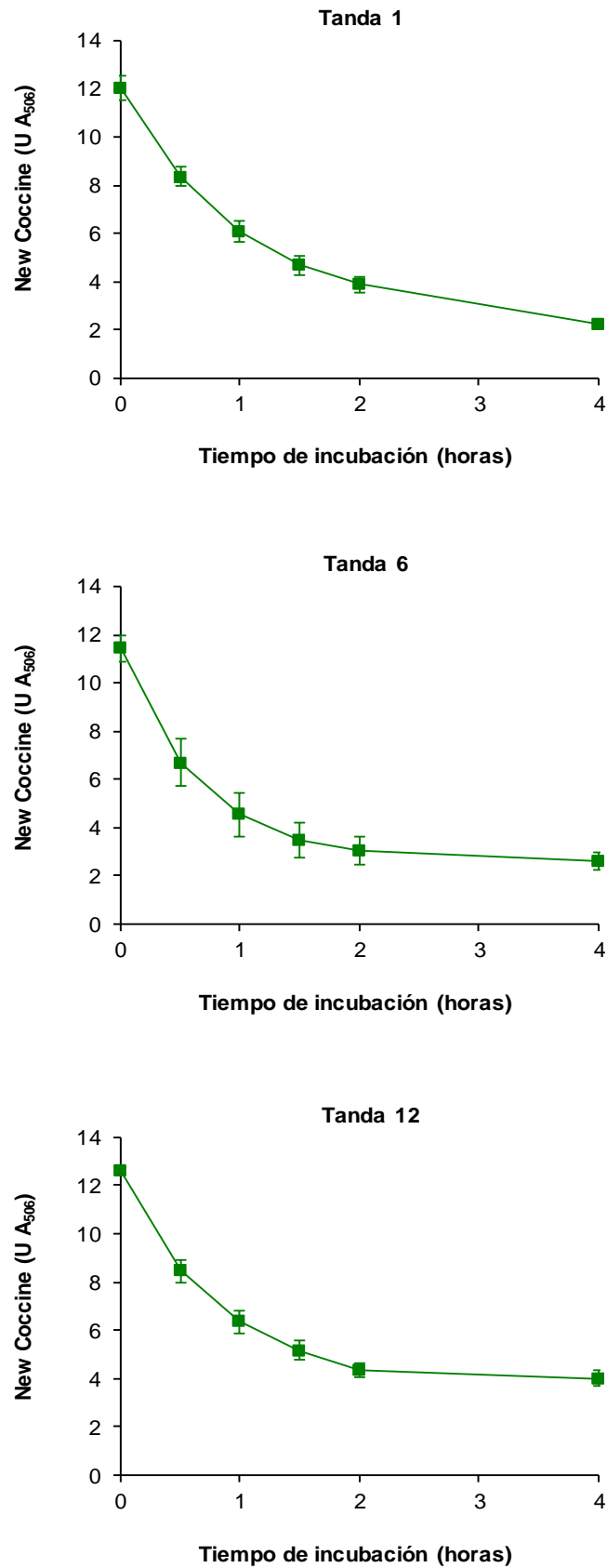


**Figura 3.96. Producción de TBARS por *A.nidulans* en tandas diarias sucesivas.** Las incubaciones para la inducción del ciclo redox realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 5 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 110  $\mu\text{M}$ , desoxirribosa 2,8 mM y  $2,0 \pm 0,0$  mg/ml de micelio. Glucosa 10mM fue añadida a las 4h del inicio de cada tanda. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.

### 3.6.2.3. Degradación de New Coccine en tandas sucesivas de oxidación avanzada

Para poner a prueba el sistema en el caso de degradación de un contaminante, se realizaron tandas de oxidación avanzada de New Coccine durante 12 días consecutivos, empleando una concentración de 500  $\mu\text{M}$  de dicho compuesto y las condiciones óptimas de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  previamente determinadas.

Los perfiles de decoloración fueron similares para todas las tandas, observándose únicamente una velocidad de degradación ligeramente menor en la primera tanda, posiblemente debido a que el hongo necesite tiempo para adaptarse al proceso, mejorándose el rendimiento en tandas posteriores. Como ejemplo para mostrar la uniformidad en el comportamiento del sistema durante las diferentes tandas, se muestran los perfiles de degradación de las tandas 1, 6 y 12 (figura 3.97). En los tres casos se observa la decoloración del New Coccine durante 4h, con una velocidad promedio de  $6,5 \pm 0,3$  U  $A_{506}$ /h durante la primera hora de incubación. En la figura 3.98 se presentan los porcentajes de decoloración obtenidos en cada tanda, tras 1 y 4 h de incubación, que en promedio oscilaron entre el 55 y el 75% respectivamente.



**Figura 3.97.** Decoloración de New Coccine por *A. nidulans* en tandas sucesivas de biooxidación avanzada. Las incubaciones se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 7 y contenían 2,6-DBQ 500  $\mu$ M, Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu$ M, EDTA 110  $\mu$ M, New Coccine 500  $\mu$ M y 2,1  $\pm$  0,1 mg/ml de micelio. Glucosa 10 mM fue añadida a las 6 h del comienzo de cada tanda. Estas se llevaron a cabo en matraces de 100ml de capacidad con 40 ml de mezcla de incubación a 28°C y 180rpm.



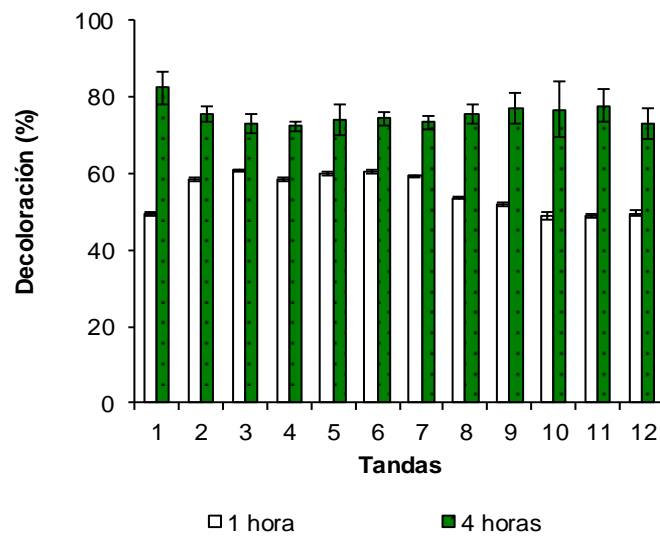


Figura 3.98. Porcentajes de decoloración de New Coccine en tandas sucesivas de biooxidación avanzada con *A. nidulans*. Se muestran los porcentajes de degradación obtenidos tras 1 h y 4 h de incubación.

## **4. CONCLUSIONES**



1. El mecanismo inducible de producción extracelular de radicales hidroxilo, basado en el establecimiento de ciclos redox de quinonas, se encuentra ampliamente distribuido entre microorganismos, demostrándose por primera vez en esta tesis su existencia en el hongo de podredumbre blanca *Coriopsis rigida*, los hongos ascomicetos *Aspergillus nidulans* y *Penicillium oxalicum* y en las bacterias unicelulares *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*.
2. Los elementos imprescindibles para que los ciclos de quinonas se establezcan son: una quinona que actúe como transportador electrónico entre equivalentes de reducción intracelular y el oxígeno extracelular, un sistema enzimático intracelular que reduzca divalentemente la quinona a hidroquinona, y un sistema enzimático o químico que oxide monovalentemente a la hidroquinona.
3. En los hongos de podredumbre blanca, como *Coriopsis rigida*, los ciclos redox de quinonas se caracterizan por ser los más versátiles, ya que la oxidación de la hidroquinona puede ser llevada a cabo por las enzimas ligninolíticas y, en su defecto, por cationes metálicos como  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Mn}^{3+}$ .
4. En general las condiciones óptimas de producción de  $\cdot\text{OH}$  se obtienen a pH 7, empleando el complejo Fe-EDTA como oxidante de la hidroquinona.
5. En hongos de podredumbre parda, como *Gloeophyllum trabeum*, el  $\text{Mn}^{2+}$  reacciona con el radical anión superóxido, generado en el ciclo redox de la 2,5-DBQH<sub>2</sub>, incrementando los niveles de peróxido de hidrógeno producidos, y dando lugar a  $\text{Mn}^{3+}$  que cataliza la oxidación de dicha hidroquinona, aumentando la velocidad del ciclo.
6. Se ha demostrado que *Coriopsis rigida* posee una alta capacidad para degradar compuestos contaminantes, puesta de manifiesto en la eliminación de un elevado número y diversidad de colorantes textiles, debido principalmente a la expresión de una actividad lacasa con un alto potencial redox que, además, se ve potenciada en combinación con mediadores naturales y al desencadenar la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ .
7. La inducción de radicales hidroxilo en hongos y bacterias unicelulares aumenta su potencial degradativo y permite la biooxidación avanzada de diversos compuestos contaminantes como colorantes textiles, fármacos y disruptores endocrinos.
8. *Aspergillus nidulans* y el hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* pueden ser reutilizados en tandas diarias consecutivas de inducción de radicales hidroxilo para la degradación de contaminantes sin que el proceso pierda eficiencia, ya que ni la velocidad de producción de  $\cdot\text{OH}$  ni la viabilidad de los hongos se ven afectadas.

## **5. BIBLIOGRAFÍA**



- Adler, E., 1977. Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11: 169-218.
- Ahmad, M., Roberts, J.N., Hardiman, E.M., Singh, R., Eltis, L.D. y Bugg, T.D.H., 2011. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry* 50: 5096-5107.
- Aranda, E., Marco-Urrea, E., Caminal, G., Arias, M.E., García-Romera, I. y Guillén, F., 2010. Advanced oxidation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 181: 181-186.
- Arantes, V., Jellison, J. y Goodell, B., 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 323-338.
- Baban, A., Yediler, A., Lienert, D., Kemerdere, N. y Kettrup, A., 2003. Ozonation of high strength segregated effluents from a woollen textile dyeing and finishing plant. *Dyes and Pigments* 58: 93-98.
- Baker, W., 1941. Derivatives of pentahydroxybenzene, and a synthesis of pedicellin. *J. Chem. Soc.* 1941: 662-670.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- Barbusinski, K., 2009. Fenton reaction - Controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering S* 16: 347-358.
- Barr, D.P. y Aust, S.D., 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: A78-A87.
- Barr, D.P., Shah, M.M., Grover, T.A. y Aust, S.D., 1992. Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 480-485.
- Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., Escaso, V., Guillén, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 1998. Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 325-332.
- Bautista, P., Mohedano, A.F., Casas, J.A., Zazo, J.A. y Rodríguez, J.J., 2008. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 1323-1338.
- Blánquez, A., 2015. Caracterización y función biológica de la lacasa producida por *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. Aprovechamiento de su potencial oxidativo para la degradación de contaminantes ambientales, Tesis doctoral, Universidad de Alcalá.
- Bokare, A.D. y Choi, W., 2014. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials* 275: 121-135.
- Bouafia-Chergui, S., Oturan, N., Khalaf, H. y Oturan, M.A., 2010. Parametric study on the effect of the ratios [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]/[Fe<sup>3+</sup>] and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]/[substrate] on the photo-Fenton degradation of ationic azo dye Basic Blue 41. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 45: 622-629.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267: 99-102.
- Brock, B.J., Rieble, S. y Gold, M.H., 1995. Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3076-3081.
- Brunmark, A. y Cadenas, E., 1989. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.* 7: 435-477.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D. y Aust, S.D., 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.
- Call, H.P. y Mücke, I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup>-process). *J. Biotechnol.* 53: 163-202.

- Camarero, S., Galletti, G.C. y Martínez, A.T., 1994. Preferential degradation of phenolic lignin-units by two white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4509-4516.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1775-1784.
- Cameron, M.D. y Aust, S.D., 1999. Degradation of chemicals by reactive radicals produced by cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 367: 115-121.
- Cañas, A.I., Alcalde, M., Plou, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Camarero, S., 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41: 2964-2971.
- Cañas, A.I. y Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.* 28: 694-705.
- Chamarro, E., Marco, A. y Esplugas, S., 2001. Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Res.* 35: 1047-1051.
- Chen, M., Ding, W.H., Wang, J. y Diao, G.W., 2013. Removal of azo dyes from water by combined techniques of adsorption, desorption, and electrolysis based on a supramolecular sorbent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52: 2403-2411.
- Cohen, R., Suzuki, M.R. y Hammel, K.E., 2004. Differential stress-induced regulation of two quinone reductases in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 324-331.
- Colpa, D.I., Fraaije, M.W. y van Bloois, E., 2014. DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 1-7.
- Cragg, S.M., Beckham, G.T., Bruce, N.C., Bugg, T.D.H., Distel, D.L., Dupree, P., Etxabe, A.G., Goodell, B.S., Jellison, J., McGeehan, J.E., Queen-Mason, S.J., Schnorr, K., Walton, P.H., Watts, J.E.M. y Zimmer, M., 2015. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 29: 108-119.
- Daniel, G., Jellison, J., Goodell, B., Paszczynski, A. y Crawford, R., 1991. Use of monoclonal antibodies to detect Mn(II)-peroxidase in birch wood degraded by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 674-680.
- Daniel, G., Pettersson, B., Nilsson, T., and Volc, J. Cytoplasmic and extracellular localization of manganese II dependant peroxidase(s) in white rot fungi during degradation of woody materials. 1989.
- Ref Type: Unpublished Work
- Daniel, G., Pettersson, B., Nilsson, T. y Volc, J., 1990. Use of immunogold cytochemistry to detect Mn(II)-dependent and lignin peroxidases in wood degraded by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. *Can. J. Bot.* 68: 920-933.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubatova, E. y Halada, P., 2007. Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6241-6253.
- Daniel, G.F., Nilsson, T. y Pettersson, B., 1988. Immunolabelling studies on the detection of enzymes during the degradation of wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Doc. No IRG / WP / 1-18.
- Daughton, C.G. y Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Persp.* 107: 907-938.
- Diagne, M., Oturan, N., Oturan, M.A. y Sires, I., 2009. UV-C light-enhanced photo-Fenton oxidation of methyl parathion. *Environ. Chem. Lett.* 7: 261-265.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E.L., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.



- Enoki, A., Tanaka, H. y Itakura, S., 2003. Physical and chemical characteristics of glycopeptide from wood decay fungi. En "Wood deterioration and preservation. Advances in our changing world" (Goodell, B., Nicholas, D.D. y Schultz, T.P. eds), Oxford University Press, Washington, DC, pp. 140-153.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G., 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 235-240.
- Fengel, D. y Wegener, G., 1984. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de Gruyter, Berlin.
- Fillat, U., Prieto, A., Camarero, S., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2012. Biodeinking of flexographic inks by fungal laccases using synthetic and natural mediators. *Biochem. Eng. J.* 67: 97-103.
- Flournoy, D.S., Paul, J.A., Kirk, T.K. y Highley, T.L., 1993. Changes in the size and volume of pores in sweetgum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Holzforschung* 47: 297-301.
- Forney, L.J., Reddy, C.A., Tien, M. y Aust, S.D., 1982. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 257: 11455-11462.
- Forss, J. y Welander, U., 2011. Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65: 227-237.
- García-Martín, A.B., 2017. Biooxidación avanzada de compuestos modelo de lignina y contaminantes por el hongo ligninolítico *Pleurotus eryngii*, Tesis doctoral, Universidad de Alcalá.
- Gerzabek, M.H., Barcelo, D., Bellin, A., Rijnaarts, H.H.M., Slob, A., Darmendrail, D., Fowler, H.J., Negrel, P., Frank, E., Grathwohl, P., Kuntz, D. y Barth, J.A.C., 2007. The integrated project AquaTerra of the EU sixth framework lays foundations for better understanding of river-sediment-soil-groundwater systems. *Journal of Environmental Management* 84: 237-243.
- Gil, M.J., Soto, A.M., Usma, J.I. y Gutiérrez, O., 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia* 7: 52-73.
- Gold, M.H., Youngs, H.L. y Gelpke, M.D., 2000. Manganese peroxidase. *Met. Ions Biol. Syst.* 37: 559-586.
- Gómez-Toribio, V., 2006. Mecanismos de producción extracelular de especies reactivas de oxígeno por el hongo ligninolítico *Pleurotus eryngii*, Tesis doctoral, Univ. Complutense, Madrid.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F., 2009a. Enhancing the production of hydroxyl radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3954-3962.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F., 2009b. Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3944-3953.
- Goodell, B., 2003. Brown-rot fungal degradation of wood: Our evolving view. En "Wood deterioration and preservation. Advances in our changing world" (Goodell, B., Nicholas, D.D. y Schultz, T.P. eds), Oxford University Press, Washington, pp. 97-118.
- Goodell, B., Daniel, G., Jellison, J. y Qian, Y.H., 2006. Iron-reducing capacity of low-molecular-weight compounds produced in wood by fungi. *Holzforschung* 60: 630-636.
- Goodell, B., Jellison, J., Daniel, G. y Yuhui, Q., 1997a. Redox cycling chelators isolated from *Gloeophyllum trabeum* and their effect on wood fibers. *Proc. TAPPI Biol. Sci. Symp.*, San Francisco, 19-23 October 463-471.
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczyński, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L. y Xu, G., 1997b. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J. Biotechnol.* 53: 133-162.

- Goodell, B., Yamamoto, K., Jellison, J., Nakamura, M., Fujii, T., Takabe, K. y Hayashi, N., 1998. Laccase immunolabelling and microanalytical analysis of wood degraded by *Lentinus edodes*. *Holzforschung* 52: 345-350.
- Guillén, F. y Evans, C.S., 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 2000a. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 142-147.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 1992. Aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*: substrate specificity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing system. En "Biotechnology in Pulp and Paper Industry" (Kuwahara, M. y Shimada, M. eds), UNI Pub. Co., Ltd., Tokyo, pp. 371-376.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S., 1994. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 465-470.
- Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C. y Martínez, A.T., 1997. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 190-199.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2000b. Oxygen activation during the oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 170-175.
- Guivarch, E., Trevin, S., Lahitte, C. y Oturan, M.A., 2003. Degradation of azo dyes in water by Electro-Fenton process. *Environ. Chem. Lett.* 1: 38-44.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T., 1994. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H.C.H. y Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. *Chemosphere* 36: 357-394.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1981. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 128: 347-352.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation of biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A. y Ryan, Z.C., 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 445-453.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E. y Palmer, J.M., 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 195: 242-246.
- Henry, W.P., 2003. Non-enzymatic iron, manganese, and copper chemistry of potential importance in wood decay. En "Wood deterioration and preservation. Advances in our changing world" (Goodell, B., Nicholas, D.D. y Schultz, T.P. eds), Oxford University Press, Washington, DC, pp. 175-195.
- Higuchi, T., 1985. Biosynthesis of lignin. En "Biosynthesis and biodegradation of wood components" (Higuchi, T. ed.), Academic Press, Orlando, pp. 141-228.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C. y Lundell, T., 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 871-897.
- Hsueh, C.L., Huang, Y.H., Wang, C.C. y Chen, C.Y., 2005. Degradation of azo dyes using low iron concentration of Fenton and Fenton-like system. *Chemosphere* 58: 1409-1414.
- Hyde, S.M. y Wood, P.M., 1997. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. *Microbiology* 143: 259-266.

- Ikehata, K., Gamal El-Din, M. y Snyder, S.A., 2008. Ozonation and advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater. *Ozone-Sci. Eng.* 30: 21-26.
- Jackson, J. y Sutton, R., 2008. Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Sci. Total Environ.* 405: 153-160.
- Jensen, K.A., Bao, W.L., Kawai, S., Srebotnik, E. y Hammel, K.E., 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3679-3686.
- Johannes, C. y Majcherczyk, A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524-528.
- Joseleau, J.-P., Gharibian, S., Comtat, J., Lefebvre, A. y Ruel, K., 1994. Indirect involvement of ligninolytic enzyme systems in cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 255-264.
- Kawai, S., Umezawa, T. y Higuchi, T., 1989. Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde. *Wood Res.* 76: 10-16.
- Kerem, Z., Jensen, K.A. y Hammel, K.E., 1999. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Lett.* 446: 49-54.
- Knop, D., Yarden, O. y Hadar, Y., 2015. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 1025-1038.
- Kremer, S.M. y Wood, P.M., 1992. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b2. *Eur. J. Biochem.* 205: 133-138.
- Krueger, M.C., Bergmann, M. y Schlosser, D., 2016. Widespread ability of fungi to drive quinone redox cycling for biodegradation. *FEMS Microbiol. Lett.* 363.
- Lade, H., Govindwar, S. y Paul, D., 2015. Mineralization and detoxification of the carcinogenic azo dye congo red and real textile effluent by a polyurethane foam immobilized microbial consortium in an upflow column bioreactor. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12: 6894-6918.
- Lee, S.-S., Moon, D.-S., Choi, H.T. y Song, H.-G., 2007. Purification and characterization of an intracellular NADH:quinone reductase from *Trametes versicolor*. *J. Microbiol.* 45: 333-338.
- Leonowicz, A., Edgell, R.U. y Bollag, J.M., 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* 137: 89-96.
- Li, Y. y Trush, M.A., 1993. Oxidation of hydroquinone by copper: chemical mechanism and biological effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 346-355.
- Liou, R.M., Chen, S.H., Hung, M.Y., Hsu, C.S. y Lai, J.Y., 2005. Fe (III) supported on resin as effective catalyst for the heterogeneous oxidation of phenol in aqueous solution. *Chemosphere* 59: 117-125.
- Liu, G.F., Zhou, J.T., Wang, J., Zhou, M., Lu, H. y Jin, R.F., 2009. Acceleration of azo dye decolorization by using quinone reductase activity of azoreductase and quinone redox mediator. *Bioresource Technol.* 100: 2791-2795.
- Lloret, L., Eibes, G., Lu-Chau, T.A., Moreira, M.T., Feijoo, G. y Lema, J.M., 2010. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochem. Eng. J.* 51: 124-131.
- Lyche, J.L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Karlsson, C., Stavik, B., Berg, V., Skare, J.U., Alestrom, P. y Ropstad, E., 2011. Natural mixtures of POPs affected body weight gain and induced transcription of genes involved in weight regulation and insulin signaling. *Aquatic Toxicology* 102: 197-204.
- Macias-Sanchez, J., Hinojosa-Reyes, L., Guzman-Mar, J.L., Peralta-Hernandez, J.M. y Hernandez-Ramirez, A., 2011. Performance of the photo-Fenton process in the degradation of a model azo dye mixture. *Photochemical & Photobiological Sciences* 10: 332-337.

- Maezono, T., Tokumura, M., Sekine, M. y Kawase, Y., 2011. Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: Generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. *Chemosphere* 82: 1422-1430.
- Majeau, J.A., Brar, S.K. y Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technol.* 101: 2331-2350.
- Makela, M.R., Marinovic, M., Nousiainen, P., Liwanag, A.J.M., Benoit, I., Sipila, J., Hatakka, A., de Vries, R.P. y Hilden, K.S., 2015. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. *Adv. Appl. Microbiol.* 91: 63-137.
- Marco, A., Esplugas, S. y Saum, G., 1997. How and why to combine chemical and biological processes for wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 35: 321-327.
- Marco-Urrea, E., Aranda, E., Caminal, G. y Guillén, F., 2009. Induction of hydroxyl radical production in *Trametes versicolor* to degrade recalcitrant chlorinated hydrocarbons. *Bioresource Technol.* 100: 5757-5762.
- Martínez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Rio, J.C. y Gutiérrez, A., 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Mason, M.G., Nicholls, P., Divne, C., Hallberg, B.M., Henriksson, G. y Wilson, M.T., 2003. The heme domain of cellobiose oxidoreductase: a one-electron reducing system. *Biochim. Biophys. Acta* 1604: 47-54.
- Mayer, A.M. y Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Picard, P. y Surampalli, R.Y., 2014. Analysis and advanced oxidation treatment of a persistent pharmaceutical compound in wastewater and wastewater sludge-carbamazepine. *Sci. Total Environ.* 470: 58-75.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. y Yaropolov, Y.I., 2007. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43: 523-535.
- Moya, R., 2011. Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica, Tesis doctoral, Universidad de Alcalá.
- Moya, R., Hernández, M., García-Martín, A.B., Ball, A.S. y Arias, M.E., 2010. Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresour. Technol.* 101: 2224-2229.
- Murugesan, K., Chang, Y.Y., Kim, Y.M., Jong-Rok, J., Kim, E.J. y Chang, Y.S., 2010. Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Res.* 44: 298-308.
- Navalon, S., Alvaro, M. y García, H., 2010. Heterogeneous Fenton catalysts based on clays, silicas and zeolites. *Applied Catalysis B-Environmental* 99: 1-26.
- Neppolian, B., Jung, H., Choi, H., Lee, J.H. y Kang, J.W., 2002. Sonolytic degradation of methyl tert-butyl ether: the role of coupled fenton process and persulphate ion. *Water Res.* 36: 4699-4708.
- Newcombe, D., Paszczynski, A., Gajewska, W., Kroger, M., Feis, G. y Crawford, R., 2002. Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum* species. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 506-517.
- Niemann, G.J., Eijkel, G.B., Konings, H., Pureveen, J.B.M. y Boon, J.J., 1993. Chemical differences between wildtype and gibberellin mutants of tomato determined by pyrolysis-mass spectrometry. *Plant Cell Environ.* 16: 1059-1069.
- Nikulina, G., Deveikis, D. y Pyshnov, G., 1995. Toxicodynamics of anion aerodyes and the distant effects after their resorption from skin. *Medsitsina Truda i Promyshlennaya Ekologiya* 0: 25-28.
- Nimz, H., 1974. Beech lignin - Proposal of a constitutional scheme. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13: 313-321.

- Oller, I., Malato, S. y Sánchez-Pérez, J.A., 2011. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review. *Sci. Total Environ.* 409: 4141-4166.
- Öllinger, K., Buffinton, G.D., Ernster, L. y Cadenas, E., 1990. Effect of superoxide dismutase on the autoxidation of substituted hydro- and semi-naphthoquinones. *Chem. Biol. Interact.* 73: 53-76.
- Ollinger, K., Buffinton, G.D., Ernster, L. y Cadenas, E., 1990. Effect of superoxide-dismutase on the autoxidation of substituted hydro-naphthoquinones and semi-naphthoquinones. *Chem. -Biol. Interact.* 73: 53-76.
- Oturan, M.A. y Aaron, J.J., 2014. Advanced oxidation processes in water/wastewater treatment: principles and applications. A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44: 2577-2641.
- Pal, A., Gin, K.Y.H., Lin, A.Y.C. y Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* 408: 6062-6069.
- Paszczynski, A., Crawford, R., Funk, D. y Goodell, B., 1999. De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 674-679.
- Patridge, E.V. y Ferry, J.G., 2006. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *J. Bacteriol.* 188: 3498-3506.
- Pera-Titus, M., García-Molina, V., Baños, M.A., Giménez, J. y Esplugas, S., 2004. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl. Catal. B: Environ.* 47: 219-256.
- Perez-Moya, M., Graells, M., Castells, G., Amigo, J., Ortega, E., Buhigas, G., Perez, L.M. y Mansilla, H.D., 2010. Characterization of the degradation performance of the sulfamethazine antibiotic by photo-Fenton process. *Water Res.* 44: 2533-2540.
- Petrovic, M., Gonzalez, S. y Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trac-Trend Anal. Chem.* 22: 685-696.
- Pick, E. y Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38: 161-170.
- Pulgarin, C., Invernizzi, M., Parra, S., Sarria, V., Polania, R. y Peringer, P., 1999. Strategy for the coupling of photochemical and biological flow reactors useful in mineralization of biorecalcitrant industrial pollutants. *Catal. Today* 54: 341-352.
- Pupo Nogueira, R.F. y Guimaraes, J.R., 2000. Photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol by ferrioxalate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Water Res.* 34: 895-901.
- Puvaneswari, N., Muthukrishnan, J. y Gunasekaran, P., 2006. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian J. Exp. Biol.* 44: 618-626.
- Qi, W.H. y Jellison, J., 2004. Induction and catalytic properties of an intracellular NADH-dependent 1,4-benzoquinone reductase from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54: 53-60.
- Rau, J. y Stolz, A., 2003. Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawsone-dependent azo reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3448-3455.
- Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilar, R., Lindquist, E.A., Sun, H., LaButti, K.M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S.E., Pisabarro, A.G., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D.S. y Grigoriev, I.V., 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 111: 9923-9928.

- Rodríguez, J., Parra, C., Contreras, D., Freer, J. y Baeza, J., 2001. Dihydroxybenzenes: driven Fenton reactions. *Water Sci. Technol.* 44: 251-256.
- Salgado, P., Melin, V., Contreras, D., Moreno, Y. y Mansilla, H.D., 2013. Fenton Reaction Driven by Iron Ligands. *Journal of the Chilean Chemical Society* 58: 2096-2101.
- Sanchez-Lopez, M.I., Vanhulle, S.F., Mertens, V., Guerra, G., Figueroa, S.H., Decock, C., Corbisier, A.M. y Penninckx, M.J., 2008. Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: Potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. *African Journal of Biotechnology* 7: 1983-1990.
- Saparrat, M.C.N., Balatti, P.A., Arambarri, A.M. y Martínez, M.J., 2014. *Coriolopsis rigida*, a potential model of white-rot fungi that produce extracellular laccases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 607-617.
- Saparrat, M.C.N., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1534-1540.
- Schoemaker, H.E., 1990. On the chemistry of lignin degradation. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 109: 255-272.
- Scott, J.P. y Ollis, D.F., 1995. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: Review and recommendations. *Environmental Progress* 14: 88-103.
- Shimada, M., Ohta, A., Kurosaka, H., Hattori, T., Higuchi, T. y Takahashi, M., 1989. Roles of secondary metabolism of wood rotting fungi in biodegradation of lignocellulosic materials. En "Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation (ACS Symp. Ser. 399)" (Lewis, N.G. y Paice, M.G. eds), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 412-425.
- Shu, H.Y. y Huang, C.R., 1995. Degradation of commercial azo dyes in water using ozonation and UV enhanced ozonation process. *Chemosphere* 31: 3813-3825.
- Simonsen, J., Freitag, C.M., Silva, A. y Morrell, J.J., 2004. Wood/plastic ratio: Effect on performance of borate biocides against a brown rot fungus. *Holzforschung* 58: 205-208.
- Sjöström, E., 1993. *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*, Academic Press, San Diego.
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61-73.
- Srebotnik, E., Messner, K. y Foisner, R., 1988. Penetrability of white rot degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2608-2614.
- Stenzen, S., 1979. Oxidation of phenolates and phenylenediamines by 2-alkanonyl radicals produced from 1,2-dihydroxy- and 1-hydroxy-2-alkoxylalkyl radicals. *J. Phys. Chem.* 83: 595-599.
- Suzuki, M.R., Hunt, C.G., Houtman, C.J., Dalebroux, Z.D. y Hammel, K.E., 2006. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. *Environ. Microbiol.* 8: 2214-2223.
- Swallow, A.J., 1982. Physical chemistry of semiquinones. En "Function of quinones in energy conserving systems" (Trumpower, B.L. ed.), Academic Press, London, pp. 59-72.
- Tanaka, H., Itakura, S. y Enoki, A., 1999a. Hydroxyl radical generation and phenol oxidase activity in wood degradation by the white-rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *Mater. Organismen* 33: 91-105.
- Tanaka, H., Itakura, S. y Enoki, A., 1999b. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung* 53: 21-28.
- Tarr, M.A., Stromeyer, A.M., Pradhan, A., Xu, G.X., Wei, B. y Zheng, W.X., 2004. Advances in pollutant-selective Fenton oxidation technologies. *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.* 228: U602.
- Torrades, F., García-Montaño, J., García-Hortal, J.A., Domènech, X. y Peral, J., 2004. Decolorization and mineralization of commercial reactive dyes under solar light assisted photo-Fenton conditions. *Sol. Energy* 77: 573-581.
- Ullrich, R. y Hofrichter, M., 2005. The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. *FEBS Lett.* 579: 6247-6250.

- Uden, G. y Bongaerts, J., 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1320: 217-234.
- Varela, E., Mester, T. y Tien, M., 2003. Culture conditions affecting biodegradation components of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Arch. Microbiol.* 180: 251-256.
- Varela, E. y Tien, M., 2003. Effect of pH and oxalate on hydroquinone-derived hydroxyl radical formation during brown rot wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6025-6031.
- Viitanen, H., 1994. Factors affecting the development of biodeterioration in wooden constructions. *Materials and Structures* 27: 483-493.
- Vinodgopal, K. y Peller, J., 2003. Hydroxyl radical-mediated advanced oxidation processes for textile dyes: a comparison of the radiolytic and sonolytic degradation of the monoazo dye Acid Orange 7. *Res. Chem. Intermed.* 29: 307-316.
- Wariishi, H., Morohoshi, N. y Haraguchi, T., 1987. Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor* VII. Effective degradation of syringyl type  $\beta$ -aryl ether lignin model compound by laccase III. *Mokuzai Gakkaishi* 33: 892-898.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22: 161-187.
- Xu, F., Shin, W.S., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M. y Solomon, E.I., 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *BBA Protein Struct. Mol. Enzym.* 1292: 303-311.
- Xu, G. y Goodell, B., 2001. Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *J. Biotechnol.* 87: 43-57.
- Yelle, D.J., Ralph, J., Lu, F.C. y Hammel, K.E., 2008. Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environ. Microbiol.* 10: 1844-1849.
- Youn, H. y Kang, S.O., 2000. Enhanced sensitivity of *Streptomyces seoulensis* to menadione by superfluous lipoamide dehydrogenase. *FEBS Lett.* 472: 57-61.
- Youn, H., Kwak, J., Youn, H.D., Hah, Y.C. y Kang, S.O., 1998. Lipoamide dehydrogenase from *Streptomyces seoulensis*: biochemical and genetic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 405-418.
- Zapanta, L.S. y Tien, M., 1997. The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53: 93-102.