

Facultad de Química – UDELAR

Doctorado en Química

Fisiología de hongos filamentosos : efecto del Zn y el Mn

Ing. Quím. Claudia Ibáñez

Director Académico: Prof. María Pía Cerdeiras

Director Científico: Dra Gianna Cecchetto

Unidad Académica de Gestión
Tecnológica - Cátedra de Microbiología

Diciembre 2010

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, gracias al apoyo económico brindado por ISUSA (Industrias Sulfúricas del Uruguay S.A) y a CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) al inicio del estudio.

Un agradecimiento y reconocimiento especial a mis directoras de tesis Pia y Gianna por su trabajo y por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación.

Al Directorio de ISUSA por el apoyo continuo.

A Mario por la idea original de reivindicar el uso de Zn como funguicida.

Agradezco también a todos mis compañeros de GESTEC (los que están hoy y los que no trabajan más con nosotros), a todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología especialmente los compañeros del laboratorio 14 y 12, que en el día a día me enseñaron muchas cosas (demasiadas para enumerarlas) sin las cuales no hubiera llegado hasta aquí. En particular Silvana A., Mariana R. y Mariana B.

A los compañeros del Departamento Forestal de la Facultad de Agronomía que “fueron invadidos” por nuestros ensayos y han brindado un desinteresado y continuo apoyo, Danila, Rafael, Marta y muy especialmente Carlos, a quien agradezco el apoyo y la confianza.

A Lourdes, que con buena onda siempre me ha salvado de muchos apuros.

A Nami quien ha colaborado siempre a cualquier hora y desde cualquier lugar del mundo.

A Tania, Mario y Mamá, pilares esenciales que compartieron conmigo esta ruta, haciéndola más fácil,
gracias por su amor y compañerismo.

A todas aquellas personas que contribuyeron de una forma u otra a este trabajo.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

AAO: Aril alcohol oxidasa

AAD: Aril alcohol deshidrogenasa

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: Ácido desoxiribonucleico copia

ARN : Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenina trifosfato

BLAST: (*Basic Local Alignment Search Tool*), programa de alineamiento de secuencias de ADN

ClustalW: Programa de alineamiento múltiple de secuencias de ADN o de proteínas

Lac : Lacasa

LiP : Lignino peroxidasa

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CIMD: Concentración inhibitoria mínima de decoloración

MnP : Manganeso peroxidasa

mU : Mili unidad enzimática

MTs: Metelotioneinas

P. chrysosporium: *Phanerochaete chrysosporium*

P. atropurpurascens: *Punctularia atropurpurascens*

Poly R-478: Colorante de poliantraquinona

QR: Quinona reductasa

RBBR: Remazol Brilliant Blue

RT-PCR : Transcripción reversa del mARN y PCR

VP: Peroxidasa versátil

INDICE GENERAL

	Página
Título	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	iii
Indice General	iii
Indice de tablas	iv
Indice de figuras	iv
Resumen	vi
1 - Introducción	
1 Los metales y los sistemas biológicos.....	2
2 Los hongos de la podredumbre blanca de la madera.....	7
2. 1 La madera.....	7
2. 2 La lignina.....	9
2. 3 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> como modelo.....	13
2. 4 <i>Punctularia atropurpurascens</i> completa el estudio.....	15
3 Preservación de la madera; por qué ensayar soluciones de Zn y Mn como conservadores.....	17
4 Zn, Mn y los basidiomycetes: antecedentes.....	19
5 Bases para el desarrollo de un fungicida con sales de Zn y Mn: Objetivos de este trabajo.....	25
6 Estrategias	26
2 - Influencia del Zn y Mn en la fisiología fúngica	
2.1 Efecto de los sulfatos puros de Zn y Mn sobre la fisiología de los hongos filamentosos.....	32
2.2 Resultados y discusión.	
2.2.1 Efecto de los metales sobre la germinación de conidios.....	32
2.2.2 Efecto de los metales sobre el crecimiento micelial.....	34
2.2.2.1 Crecimiento en agar - malta.....	35
2.2.2.2 Crecimiento sobre madera.....	40

2.2.3. Efectos de los metales sobre el sistema enzimático ligninolítico	
2.2.3.1 Degradación de colorantes	
poliméricos.....	41
2.2.3.2 Actividad de MnP, LiP y Lac, determinadas espectrofotométricamente.....	47
3 – Regulación del sistema <i>mnp</i> por zinc y manganeso	
3.1	Expresión de los genes
<i>mmps</i>	54
3.1.1 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
3.1.1.1 Análisis <i>in silico</i> de secuencia genómica de <i>P. chrysosporium</i> :	54.
3.1.1.2 Diseño de oligonucleótidos para cuantificación de <i>mmps</i> , <i>act</i> y <i>gpd</i> por qPCR.....	60
3.1.1.3 Determinación de la eficiencia de amplificación.....	63
3.1.2 Identificación de las peroxidasas de <i>Puntularia atropurpurascens</i>	
3.1.2.1 Clonado parcial de los genes <i>mmps</i> de <i>P. atropurpurascens</i> y análisis de las proteínas putativas.....	66
3.1.2.2 Diseño de oligonucleótidos para cuantificación de genes <i>mnp</i>	74
3.1.2.3 Clonado del gen <i>gpd</i> y diseño de oligonucleótidos para cuantificación.....	76.
3.1.2.4 Validación de los oligonucleótidos y determinación de la eficiencia de amplificación.....	77
3.2 Identificación de condiciones no represoras de la expresión de los genes <i>mmps</i>	
3.2.1	<i>P.</i>
<i>chrysosporium</i>	78
3.2.2	
<i>P.atropurpurascens</i>	81
3.3 Efecto del Zn ²⁺ y el Mn ²⁺ en la expresión de los genes <i>mnp</i>	
3.3.1	<i>P.</i>
<i>chrysosporium</i>	83
3.3.2	<i>Punctularia</i>
<i>atropurpurascens</i>	87
3.4	Resumen de los
resultados.....	89

4 - Aplicación de la solución obtenida del reciclado de pilas como conservador para madera	
4.1- Introducción	
El problema de las pilas	
.....	92
Procesos de reciclado existentes.....	
.....	92
Proceso hidrometalúrgico diseñado	
.....	93
4.2 - Resultados y discusión	
.....	94
4.2.1. Efectos de la solución sobre el crecimiento	
4.2.1.1 Crecimiento en agar -	
malta.....	95
4.2.1.2 Crecimiento de los hongos en madera	
Ensayos según norma EN113:1996.....	96
Readaptación de hongos a la madera.....	99
Ensayos con	
minibloques.....	100
4.2.2 Efectos de la solución sobre las enzimas ligninolíticas	
4.2.2.1 Degradación de colorantes	
poliméricos.....	102
4.2.2.2 Actividad de MnP, LiP y Lac, determinadas espectrofotométricamente.....	103
4.2.3 Ensayo de campo: cementerio de estacas.....	104
4.2.4 Ensayos adicionales.....	106
4.3 Resumen de los resultados.....	105
5	-
Conclusiones.....	107
6 - Bibliografía.....	
.....	110

7 - Materiales y métodos.....	123
8 - ANEXOS.....	141

INDICE DE TABLAS

2.1 Descripción del estado de los conidios a distintas concentraciones de metal	33
2.2 Pérdidas de masa (%) de las probetas impregnadas con la mezcla de sulfatos de Zn y Mn	41
2.3 Halo de decoloración para <i>P. atropurpurascens</i> , al adicionar ZnSO ₄	44
2.4 Halo de decoloración para <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. atropurpurascens</i> en presencia de RBBR y MnSO ₄	45
2.5 Halo de decoloración para <i>P. atropurpurascens</i> en presencia de RBBR y ZnSO ₄ - MnSO ₄	45
2.6 CIMD y CIM hallados para <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. atropurpurascens</i>	46
2.7 Coeficiente de correlación entre las curvas de crecimiento micelial y el halo de decoloración a distintas concentraciones metálicas para <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. atropurpurascens</i>	46
2.8 Actividades enzimáticas (mU) para <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. atropurpurascens</i> , en función del tiempo de cultivo (días)	47
2.9 Actividades enzimáticas (mU) de las MnP, Lac y LiP	49
2.10 Actividades enzimáticas (mU) de las MnP preformadas a las que se agregan distintas concentraciones de metales	50
3.1 Homología entre los transcritos <i>mnps</i>	57
3.2 Proteínas MnP de distintas especies de hongos descomponedores de madera	66
3.3 Porcentaje de identidad y similaridad entre los péptidos deducidos	71
3.4: Condiciones de cultivo ensayadas	79

3.5: Condiciones de cultivo ensayadas para <i>P. atropurpurascens</i>	82
3.6: Concentraciones finales en los cultivos en CLB de <i>P. chrysosporium</i>	83
4.1 Retención y pérdida de masa medias.....	98
4.2 Límite tóxico superior de la solución proveniente del proceso de reciclado	98
4.3 Pérdida de masa en los minobloques expuestos a las especies de hongos.....	100
4.4 Velocidad inicial y decoloración de RBBR y Poly-R en placa	103
4.5 Actividad enzimática determinada espectrofotométricamente.....	104
4.6 Denominación y descripción de los tratamientos del ensayo.....	105
6.1 Oligonucleótidos para cuantificar los genes <i>mnps</i> y <i>gpd</i> de <i>P.chrysosporium</i>	133
6.2 Oligonucleótidos degenerados para <i>P.atropurpurascens</i> (genes <i>mnps</i> y <i>gpd</i>).....	134
6.3 Oligonucleótidos para la cuantificación relativa de las <i>mnps</i> de <i>P.atropurpurascens</i>	134

INDICE DE FIGURAS

1.1 Diagrama de Bertrand.....	2
1.2 La lignina: a unidades fenil propanoides; b: estructura química.....	8
1.3 Esquema de la degradación de la lignina.....	10
1.4 Lignino peroxidasa (LiP) de <i>P.chrysosporium</i> : a Reacciones catalizadas; b) Ciclo catalítico.....	12

1.5 Ciclo catalítico de las MnPs de <i>P.chrysosporium</i>	13
1.6 Estructura química de RBBR y Poly – R.....	28
2.1 Fotografía del ensayo para determinar el efecto de metales sobre la germinación de conidi.....	32
2.2 Fotografías a distintos tiempos de cultivo de los conidios sobre agar- malta suplementado con soluciones de metales a distintas concentraciones	34
2.3 Curva de crecimiento en presencia de ZnSO ₄ en el medio de cultivo	36
2.4 Curva de crecimiento en presencia de MnSO ₄ en el medio de cultivo.....	37
2.5 Aspecto de <i>P. chrysosporium</i> en agar – malta en presencia de Mn.....	37
2.6 Curva de crecimiento en presencia de ZnSO ₄ - MnSO ₄	38
2.7 Velocidad inicial de crecimiento en función de la concentración de metal en la solución (mM).....	39
2.8 <i>C. versicolor</i> en agar – malta con probetas de pino.....	40
2.9 a) <i>P. chrysosporium</i> en medio conteniendo Poly-R y RBBR, en el día 5 de incubación.....	42
b) <i>P. atropurpurascens</i> en el día 9 de incubación, en medio conteniendo RBBR y Poly-R.....	42
2.10 Velocidad de crecimiento inicial en presencia de los colorantes (Poly-R y RBBR).....	42
3.1 Estructura de los genes <i>mnps</i>	56
3.2 Similitud entre las proteínas MnP	57
3.3 Regiones promotoras de genes <i>mnps</i> , con secuencias consenso correspondientes a los MREs.....	58
3.4 a) Estructura del gen <i>gpd</i> ; b) Estructura del gen β -act.....	60
3.5 Alineamiento global de las 25 <i>mnps</i>	61

4.1 Esquema del proceso de reciclado de pilas desarrollado.....	94
4.2 Curva de crecimiento en presencia de la solución proveniente del reciclado de pilas.....	95
4.3 Armado del ensayo basado en la norma EN 113.....	97
4.4 Readaptación en <i>sweetgum</i> de <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. atropurpurascens</i>	100
4.5 Corte transversal de pino atacado por: a) <i>P. atropurpurascens</i> ; b) <i>G. trabeum</i>	102
4.6 Fotografías del cementerio de estacas.....	106
A1 Curva de crecimiento en presencia de CuSO ₄	141
A2 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de CuSO ₄ y RBBR.....	143
A3 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de CuSO ₄ y Poly_R.....	143
A4 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de ZnSO ₄ y RBBR.....	145
A5 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de ZnSO ₄ y Poly-R.....	145
A6 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de ZnSO ₄ MnSO ₄ y RBBR.....	146
A7 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de ZnSO ₄ MnSO ₄ y Poly-R.....	146
A8 Halo de decoloración (mm ²) en presencia de MnSO ₄ cuando se adiciona al medio RBBR.....	147
A9 Halo de decoloración (mm ²) en presencia de MnSO ₄ cuando se adiciona al medio Poly-R.....	147
A.10 Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm ²) en presencia de la solución proveniente del proceso de reciclado de pilas en el medio RBBR	148

A.11: Crecimiento micelial y el halo de decoloración eje izquierdo) (mm²) en presencia de la solución proveniente del proceso de reciclado de pilas en el medio Poly-R

478.....148

RESUMEN

La madera, material natural degradable es susceptible a diversos agentes bióticos y abióticos de deterioro. Microorganismos e insectos constituyen los agentes bióticos; dentro de los primeros, los hongos de la podredumbre blanca de la madera poseen la habilidad de mineralizar completamente el polímero de lignina, segundo componente estructural más abundante de la madera. Esta potencialidad está basada en su sistema enzimático extracelular compuesto por diferentes tipos de enzimas (peroxidasas y oxidasas) y compuestos de bajo peso molecular. En consecuencia la madera debe ser protegida a través de tratamientos con productos efectivos, habiendo una tendencia mundial al desarrollo de productos alternativos de menor toxicidad que los existentes.

El presente trabajo plantea al uso de las sales de Zn y Mn como conservantes para maderas. Se estudia su eficacia antifúngica, empleando tanto sales puras como aquellas provenientes de un proceso de reciclado de pilas. Dichas sales han sido utilizadas a nivel industrial, interrumpiéndose su uso en 1930 debido a razones básicamente comerciales. Se plantea su aplicación debido al desarrollo en la Unidad de Gestión Tecnológica de la Facultad de Química de un proceso por vía hidrometalúrgica de reciclado de pilas comunes y alcalinas. El mismo es simple, de bajo costo y permite el aprovechamiento de los materiales que contienen a la vez que evita la posible contaminación que provoca su eliminación. El producto principal del proceso es una solución rica en Zn y Mn.

Se evalúa el efecto de las mencionadas soluciones sobre la fisiología de *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens*, dos especies representativas de los hongos causantes de podredumbre blanca en la madera, que poseen diferente sistema ligninolítico. Se estudia la influencia de dichos metales en la fisiología de ambos hongos, con dos estrategias. Una global que analiza el efecto sobre el crecimiento (desarrollo micelial y germinación de conidias) y una más específica que analiza la función ligninolítica (actividad enzimática de las peroxidasas y expresión de los genes que codifican manganeso peroxidasas). Para este último punto se identificaron por primera vez las MnPs de *P.atropurpurascens*, y se caracterizaron sus genes.

Los resultados obtenidos permiten constatar la actividad antifúngica de la solución proveniente del proceso de reciclado, así como de la mezcla de sales puras de Zn-Mn. Inhibe el crecimiento de ambos basidiomycetes, si bien *P. atropurpurascens* es más sensible a los metales. Durante el crecimiento sobre madera en ensayos de laboratorio se confirma el poder antifúngico. En campo, es lixiviada de la madera, pero un segundo tratamiento con bórax impide la pérdida de los metales. A 24 meses del comienzo del ensayo las probetas así tratadas se comparan con aquellas con CCA. A nivel del sistema ligninolítico, la solución es inhibidora de la actividad enzimática, del mismo modo que la mezcla de sales puras de Zn y Mn. El Mn presenta en términos generales un efecto inductor de los parámetros del metabolismo estudiados, con la excepción de la germinación de conidios y la expresión de los genes *mnp* de *P. chrysosporium*.

Se constató que *P. atropurpurascens* tiene por lo menos 7 MnPs con alta similitud con MnPs de otros basidiomycetes. Sus genes al igual que los de *P. chrysosporium* son inhibidos por el Zn, en tanto que el Mn inhibe la expresión de los genes de *P. atropurpurascens*.

1 - INTRODUCCIÓN

1. LOS METALES Y LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Todos los organismos vivos mantienen una continua y compleja interacción con el entorno inorgánico en el cual se encuentran y en el que desarrollan todos los procesos vitales. Ejemplos de dicha interacción se pueden encontrar en el fuerte paralelismo que existe entre la abundancia de los elementos en los seres vivos y su abundancia en la litósfera y en las aguas de mar. Los mecanismos de adaptación que han desarrollado los organismos ante la creciente industrialización del mundo son otro ejemplo, ya que se ha producido un aumento de la contaminación metálica a concentraciones tales, que se crea competencia entre elementos pesados contaminantes y aquellos esenciales para la vida (Baran, 1994).

Del entorno inorgánico y desde un punto de vista fisiológico, son aceptados universalmente veintisiete elementos como esenciales para los organismos. Los criterios que definen claramente la esencialidad de un elemento son: que el descenso de su nivel fisiológico óptimo produce deficiencias funcionales; dichas deficiencias son revertidas si ese nivel sube a valores normales; los organismos no pueden crecer ni completar sus ciclos vitales sin ese elemento; el elemento está involucrado en los procesos metabólicos y su efecto en el organismo no puede ser logrado por ningún otro elemento.

Los organismos requieren además un balance y un equilibrio entre los diferentes elementos necesarios para realizar las funciones vitales. Esto significa que un elemento esencial puede transformarse en tóxico cuando se sobrepasan ciertos límites de concentración. En base a esto, en una primera aproximación los elementos del entorno se pueden clasificar en tóxicos y no tóxicos, de acuerdo a la dosis o concentración recibida en relación a su efecto o respuesta fisiológica, estas afirmaciones son ilustradas en los llamados diagramas de Bertrand.

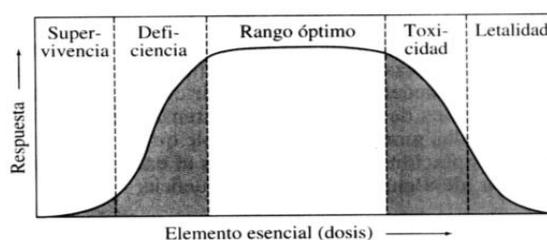


Figura 1.1: Diagrama de Bertrand (Baran, 1994).

En el caso particular de los metales pesados que son elementos esenciales, los seres vivos han desarrollado una maquinaria que garantiza un aporte adecuado de micronutrientes, que a la vez es capaz de evitar una acumulación excesiva de los mismos para mantenerlos en el rango óptimo de dosis. Los mecanismos homeostáticos involucrados mantienen la concentración citoplasmática metálica a niveles no- tóxicos suficientes para el crecimiento. Un ejemplo a destacar son los factores de transcripción de respuesta a metales. Estos factores atienden cambios en la concentración intracelular y coordinan la expresión de genes involucrados en la distribución, secuestro y uso de metales, de tal modo de

mantenerlos en un nivel óptimo tanto en condiciones de exceso como limitación. Son moléculas metalo - reguladoras producidas como respuesta al estrés metálico (Mehra *et al.*, 1991; Rutherford *et al.*, 2004).

Los metales necesarios para el crecimiento incluyen cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel; los no esenciales, comúnmente encontrados en diversos ambientes son cromo, cadmio, plomo, mercurio y plata (Gadd, 1993).

Con el fin de comprender en forma general, la intrincada y compleja problemática de los diversos efectos producidos por los metales, se deben atender tres aspectos fundamentales: las funciones de los metales, los mecanismos de toxicidad que presentan y los mecanismos de defensa de los organismos frente a los metales.

Funciones de los metales

Los iones metálicos o sus compuestos desempeñan funciones biológicas y bioquímicas claves en el desarrollo y la fisiología de los organismos vivos; se destaca por ejemplo la participación en reacciones vitales como la respiración mitocondrial, la transcripción de ADN y la fotosíntesis (Vallee *et al.*, 1990). Las funciones más importantes asociadas a los metales se pueden agrupar como: i) estructurales, como por ejemplo la participación de los fosfatos de calcio en las estructuras óseas en organismos superiores; ii) activación y transporte de oxígeno, se realiza por medio de proteínas que contienen hierro (hemoglobina, hemeritrinas) o cobre (hemocianinas); iii) transporte de electrones, cuando el sistema acepta electrones de un agente que es algo más reductor y los transforma en algo más oxidante por medio de elementos metálicos con distintos estados de oxidación Fe(II)/ Fe (III), Mo(IV)/Mo(V) / Mo(VI); iv) catalíticas en procesos redox y ácido base. En estos casos el metal forma parte del sitio activo Cu, Fe o Zn y Mg en hidrolasas y fosfatasas (Baran, 1994).

Mecanismos de toxicidad

Los síntomas tóxicos producidos por un exceso de metales pesados en los organismos vivos, se deben al conjunto de interacciones que se dan a diferente nivel. Los mecanismos moleculares de toxicidad, se basan en las propiedades químicas y físicas de los elementos metálicos y en particular en su fuerte capacidad de coordinación, lo que les permite enlazar biomoléculas. En algunos casos el contacto directo entre la especie metálica activa y los componentes celulares es un pre- requisito, siendo la membrana celular el sitio inicial de acción (Gadd, 1993). En otros casos aparecen mecanismos indirectos de toxicidad y acciones sobre las enzimas extracelulares.

Del amplio espectro de mecanismos potencialmente tóxicos de los metales, se destacan: i) el bloqueo de grupos funcionales esenciales en biomoléculas (e.g. enzimas y sistemas de transporte de

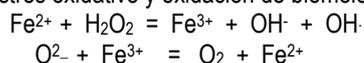
nutrientes esenciales) en general por metales pesados que no producen reacciones redox; ii) el desplazamiento y/o sustitución de los iones metálicos esenciales de biomoléculas como el reemplazo del Mg por Mn, que se enlaza al ATP en las enzimas que participan en la reacción de transferencia de fosfatos (Jellison *et al.*, 1997); iii) la inhibición de la actividad enzimática o modificaciones conformacionales, por enlace de los metales principalmente a los grupos –SH de las cisteínas de las proteínas. Esto se debe a que metales pesados como Pb(II), Hg(II) y Cd(II) tienen una fuerte afinidad por dichos grupos con los que forman sulfuros muy insolubles (Baran, 1994). A la vez el Hg produce inactivación enzimática al unirse a los grupos tioles de proteínas, por los que tiene alta afinidad (Baldrian *et al.*, 2000); iv) la producción de radicales libres que induce el estrés oxidativo, es un mecanismo indirecto de toxicidad metálica. El Cd (similar al Cu) actúa como inductor del estrés oxidativo. Las especies reactivas del oxígeno (radicales libres) pueden originarse por la autooxidación de proteínas o reacciones tipo Fenton¹. Los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS) participan de una amplia variedad de procesos biológicos y bioquímicos. Se destacan las cadenas de reacciones que producen la ruptura de macromoléculas biológicas. En todos los casos la toxicidad metálica puede producir la desnaturalización de enzimas y la ruptura de membranas celulares y organelos.

Cuando se busca estudiar el efecto de los contaminantes metálicos tóxicos, se deben tener en cuenta las rutas de absorción e incorporación a los organismos, tanto de los elementos esenciales como los no esenciales, debido a que estas rutas son eventualmente compartidas por ambos tipos de elementos (Schützendübel *et al.*, 2001).

Mecanismos de defensa de los organismos

Las estrategias utilizadas por los organismos para sobrevivir en presencia de metales pueden clasificarse de un modo muy general de acuerdo al tipo de respuesta como: i) tolerancia que incluye aquellos mecanismos que le permiten al microorganismo aceptar en cierta medida la presencia del elemento tóxico mediante modificaciones a su toxicidad o al ambiente o adaptando mecanismos propios que puedan estar involucrados en la homeostasis general (Hall, 2002); ii) evasión, el organismo evita interactuar con el elemento peligroso, a través de un mecanismo para repelerlo o por simple desplazamiento alejándose del sitio contaminado; iii) adaptación, implica cambios genéticos inducidos por la reiterada exposición al elemento, de manera que el organismo se vuelve “resistente” al mismo o

¹ La reacción de Fenton tiene un papel crucial en los procesos fisiológicos y patológicos de los organismos vivos. La mayoría de las especies reactivas del oxígeno, tales como los radicales hidróxilo se generan por esta vía. Cuando estas especies se sobrepueden o si el nivel de antioxidantes disminuye, las especies reactivas se convierten en peligrosas, provocando estrés oxidativo y oxidación de biomoléculas (Prousek, 2007). La reacción de Fenton es:



encuentra un mecanismo para tolerarlo o evitarlo; iv) defensa, respuesta inmediata a la interacción con un agente tóxico, con un cambio genético o sin él.

Las interacciones entre los metales y los hongos afectan todos los aspectos de su metabolismo, crecimiento y diferenciación, por lo cual poseen mecanismos de defensa a los metales específicos. La cantidad de metal que entra al citoplasma depende en parte del sistema de transporte de metales iónicos en las membranas celulares. Dicho sistema está compuesto de transportadores o sistemas de canales. Algunos organismos poseen transportadores específicos de metales pesados, que se encargan de retirar los iones del citoplasma para detoxificarlo, extrayéndolos hacia el exterior celular. Este mecanismo no es efectivo en el caso de transportadores celulares que no pueden discriminar entre iones de metales esenciales y no esenciales cuando tienen características químicas similares (Mehra *et al.*, 1991).

Los mecanismos de defensa más específicos como la retención, la inmovilización y el secuestro de los metales son activados al detectar cambios en la concentración metálica citoplasmática hacia niveles tóxicos. Para ello los organismos cuentan con los factores de transcripción de respuesta a metales, que regulan a múltiples niveles las proteínas involucradas en la homeostasis de los metales en todos los eucariotas (Rutherford *et al.*, 2004).

La retención o absorción de metales tóxicos por membranas celulares y citoplasma, se da en sitios potenciales de secuestro de metales como: grupos carbonilo, carboxilo, éster, amino, sulfhidrilo, hidroxilo y fosfato. También la quitina (N-acetil-D-glucosamina) y el quitosano (quitina deca- acetilada) son capaces de enlazar metales, principalmente alcalinos. Es posible predecir los potenciales sitios de unión de los metales a las células, de acuerdo a la afinidad que poseen por el ligando, a sus propiedades ácido – base, etc. (Wang *et al.*, 2009).

La inmovilización de los metales en forma de gránulos o corpúsculos insolubles, llamados corpúsculos de inclusión, tienen por cometido fijar y aislar a la especie tóxica, lo que disminuye su bio-disponibilidad y confiere tolerancia al organismo. Un ejemplo es la producción de ácido oxálico cuando el hongo crece en un medio conteniendo metales. El ácido precipita los metales formando cristales de oxalato insolubles alrededor de las paredes celulares y en el medio interno (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2003). Varios hongos de la podredumbre marrón que crecen sobre maderas tratadas con cobre, son reconocidos como grandes productores de ácido oxálico, lo cual es tenido en cuenta al aplicar preservantes. El ácido oxálico tiene un rol fundamental en la colonización de maderas tratadas con cobre por hongos resistentes al mismo (Clausen *et al.*, 2000), a la vez que les permite desarrollar una importante tolerancia al cobre (Green III *et al.*, 2003). Otro importante quelador de metales es el ácido cítrico, intermediario en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Gadd, 1999). Los hongos de la podredumbre blanca producen ácido (oxálico, cítrico, u otro) en menor extensión, evitan la entrada del metal a la célula por adsorción sobre la pared, en particular por medio de la vaina compuesta principalmente por polisacáridos que recubre las hifas (Munir *et al.*, 2004).

La compartimentación vacuolar, presenta un importante rol en la regulación de las concentraciones citosólicas de iones metálicos, tanto esenciales para las funciones metabólicas como detoxificando metales potencialmente tóxicos (Gadd, 1993). Cepas fúngicas con una deficiencia en la formación de vacuolas, son mucho más sensibles a concentraciones metálicas más altas en su entorno (Wang *et al.*, 2009).

La detoxificación química, es la transformación del elemento tóxico en una especie química no tóxica. El ejemplo más importante es la quelación intracelular de metales pesados por parte de las metalotioneínas. Éstas son proteínas de 70 – 75 aminoácidos, ricas en residuos cisteína, con los cuales quelan los metales a través del grupo sulfhidrilo. Los sulfhidrilos además tienen gran capacidad de oxidarse reversiblemente, formando puentes disulfuro con otros residuos cisteína próximos, asociándose a metales que puedan catalizar reacciones de Fenton. Se encuentran tanto en mamíferos como en microorganismos. Otras transformaciones intracelulares que sufren los metales son oxidación, reducción, metilación y dealquilación (Gadd, 1993).

La sobrevivencia fúngica en presencia de metales tóxicos depende esencialmente de dos aspectos, las propiedades intrínsecas bioquímicas y estructurales propias del hongo, que incluye cambios morfológicos y de las modificaciones ambientales de la especiación del metal y de la disponibilidad y toxicidad del metal. La importancia relativa de cada uno de estos aspectos, es difícil de evaluar (Gadd, 1993), pero su interacción debe considerarse ya que las condiciones de desarrollo del hongo, pueden determinar modificaciones en la composición de los componentes celulares, en particular la superficie celular que inducen a cambios que afectan la sobrevivencia del hongo (Wang *et al.*, 2009).

Los basidiomycetes en general son capaces de acumular grandes cantidades de metales cuando crecen en medios contaminados, como mecanismo de defensa. La bio - acumulación metálica involucra varios procesos, algunos ya mencionados: transporte a través de la membrana, secuestro en cápsulas, precipitación y reacciones de oxidación – reducción. O sea que una vez que los iones metálicos entran en la célula, son compartimentalizados en los organelos (mitocondria, vacuola, etc), para luego variar la estrategia de acumulación metálica según se trate de metales esenciales o no esenciales. Los metales esenciales son almacenados en una forma inerte, se limita su entrada a la célula y se excretan en forma activa; los metales no esenciales se almacenan internamente sin eliminación y su concentración aumenta con elevadas concentraciones externas (Wang *et al.*, 2009). En la bio- absorción se pueden alcanzar altas concentraciones de equilibrio de metales. Su mecanismo no es conocido, pero se sabe que en él participan los polisacáridos y proteínas de la capa más externa de la pared celular. La capacidad de enlazar metales es influenciada no solamente por la composición química de la estructura celular que se ocupa de unirse al metal, sino también por la composición y el pH del medio donde crece el hongo (Gabriel *et al.*, 2001). Se han encontrado Pb, Cd, Zn y Hg, en los micelios y cuerpos de fructificación de muchos basidiomycetes, considerados por esto buenos detectores de contaminación ambiental por metales (Baldrian *et al.*, 1996, 2002).

Consideradas las posibles interacciones entre metales y hongos, se describen a continuación el sustrato natural de los basidiomycetes empleados en esta investigación, la madera y la clasificación de los principales agentes bióticos que la deterioran, centrandó el análisis en la lignina y su degradación.

2. LOS HONGOS DE LA PODREDUMBRE BLANCA DE LA MADERA

2.1. LA MADERA

La madera, material natural renovable, está compuesta por celulosa (40-50% peso seco), hemicelulosa (25-40% peso seco), lignina (20-35% peso seco) y extractivos. Los porcentajes exactos de cada componente están determinados por la especie, edad y tejido considerados. La celulosa es un polímero lineal constituido por unidades celobiosa formadas de 2 moléculas de glucosa unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, con porciones cristalinas (altamente ordenadas) y con porciones amorfas (regiones no organizadas). Este polímero forma largas cadenas denominadas elementos fibrilares, que se mantienen juntos por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Varios elementos fibrilares forman las microfibrillas, que juntas en grupos constituyen las fibras de celulosa de la madera. La hemicelulosa es un polímero formado de diferentes residuos de pentosas y hexosas, que a menudo se encuentran acetiladas y en general forman cadenas ramificadas. En cambio la lignina es una red tridimensional, un heteropolímero amorfo formado por 3 tipos de unidades fenil - propanoides derivadas de sus correspondientes alcoholes p-hidroxicinámicos (figura 1. 2). Hemicelulosa y lignina envuelven las microfibrillas de celulosa y regulan el contenido de humedad en los distintos niveles de la pared celular.

Según las condiciones ambientales en las que se encuentre, la madera estará expuesta a diferentes factores bióticos y abióticos de deterioro. Dentro de los factores bióticos se encuentran cuatro tipos de organismos xilófagos: bacterias, hongos, insectos y perforadores marinos.

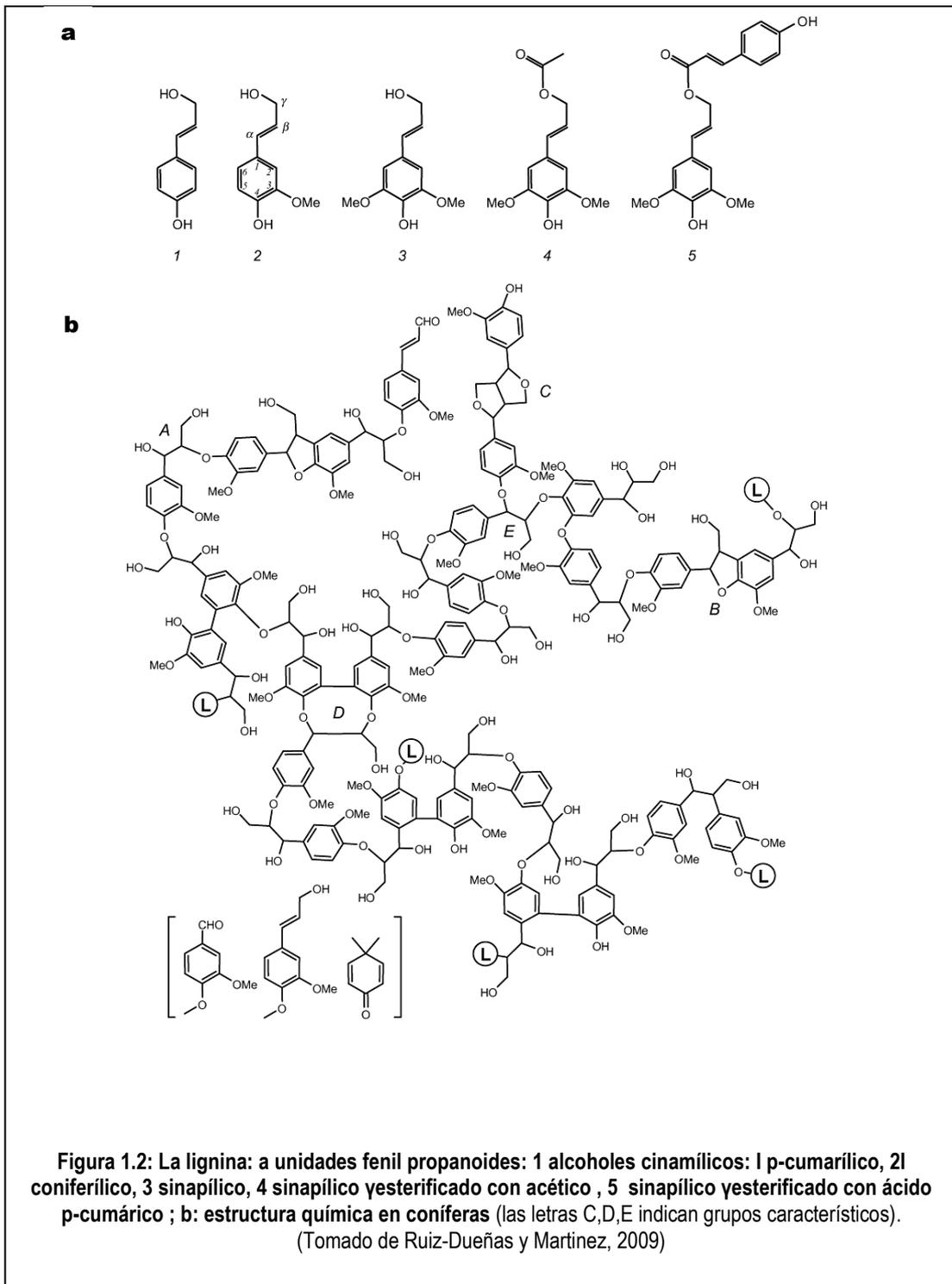
La degradación de la madera es progresiva, ocurre a través de una pérdida de estructura en su base holocelulósica (celulosa más hemicelulosa) y de lignina, siendo los hongos los principales agentes bióticos de deterioro. A nivel mundial, producen las mayores pérdidas económicas por reposición de madera en uso.

Se han descrito hasta el momento tres tipos de pudrición en la madera asociadas a hongos, de acuerdo al aspecto macroscópico que adquiere la misma en estados avanzados de deterioro:

Podredumbre blanca, degrada lignina y la lleva a CO₂ y H₂O, el residuo final rico en celulosa, es el que proporciona el color blanco a la madera;

Podredumbre marrón, descompone la celulosa dejando la lignina modificada, finalmente queda un material marrón que es lignina oxidada;

Podredumbre blanda, degrada simultáneamente lignina y celulosa pero en menor extensión que los anteriormente descritos, produce ablandamiento de la madera.



2.2. LA LIGNINA

La lignina es luego de la celulosa, el segundo material polimérico natural más abundante sobre la tierra. Como ya se mencionó es un polímero aromático tridimensional producido en los tejidos leñosos de plantas superiores, que confiere fuerza, rigidez, elasticidad y minimiza la permeabilidad del agua a través de las paredes celulares del xilema (Kirk *et al.*, 1987). Se encuentra dentro de las paredes celulares, mezclada con la hemicelulosa formando una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa, limitando el acceso de enzimas que digieren los polisacáridos (celulasas y hemicelulasas). Químicamente es un biopolímero que contiene alrededor de 10-20 % de grupos hidroxilo fenólicos; es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo, insoluble en agua y altamente ramificado. La degradación o modificación de la lignina es importante en el ciclo global del carbono (Pérez *et al.*, 2002).

Su biosíntesis ocurre a través de mecanismos de radicales libres de acoplamiento de los alcoholes fenólicos cinamílicos que originan un polímero interconectado por enlaces C-C y enlaces éter que no son hidrolizables en condiciones biológicas (Boerjan & Baucher, 2003). Por lo tanto su compleja estructura química y su hidrofobicidad hacen que la lignina sea pobremente degradada por la mayoría de los microorganismos, siendo además refractaria a la fermentación anaeróbica. Sólo pocos microorganismos, en particular los *Basidiomycetes* responsables de la podredumbre blanca de la madera, son capaces de degradarla totalmente (Kirk *et al.*, 1987; Tien *et al.*, 1983). Los sistemas ligninolíticos encontrados en estos microorganismos están formados por enzimas de amplia especificidad de sustrato que en general no se forman durante el metabolismo primario, sino que surgen en la ideofase como respuesta a una limitación de nitrógeno o carbono y se detienen cuando el crecimiento primario se restaura (Kirk *et al.*, 1987; Sayadi *et al.*, 1995).

Las enzimas que participan en la degradación de lignina son: peroxidasas (MnP, LiP), fenol oxidasas (Lacc), oxidasas que generan H₂O₂ (aril-alcohol oxidasa, AAO y glioxal oxidasa), deshidrogenasas asociadas al micelio que reducen compuestos derivados de lignina (aril- alcohol deshidrogenasa, AAD y quinona reductasa, QR). El conjunto de oxidasas extracelulares son indispensables para la función de las peroxidasas y a esta función se suman moléculas oxidantes de bajo peso molecular, entre las cuales el H₂O₂ tiene un rol central, actuando a través de la reacción de Fenton. Dicho rol se verificó al agregar catalasa a cultivos de *P. chrysosporium* que disminuyeron su actividad ligninolítica, debido a la correlación temporal entre la producción extracelular de H₂O₂ y la degradación de lignina a CO₂ (Kersten & Kirk, 1987). Las enzimas extracelulares que producen el H₂O₂ emplean como sustrato glucosa o metabolitos derivados de la glucosa.

La biodegradación de la lignina (figura 1.3), su depolimerización, ocurre por reacciones radicalarias en las que un gran número de radicales catiónicos son generados durante la oxidación, que a su vez serán subsecuentemente sustrato de las enzimas ligninolíticas.

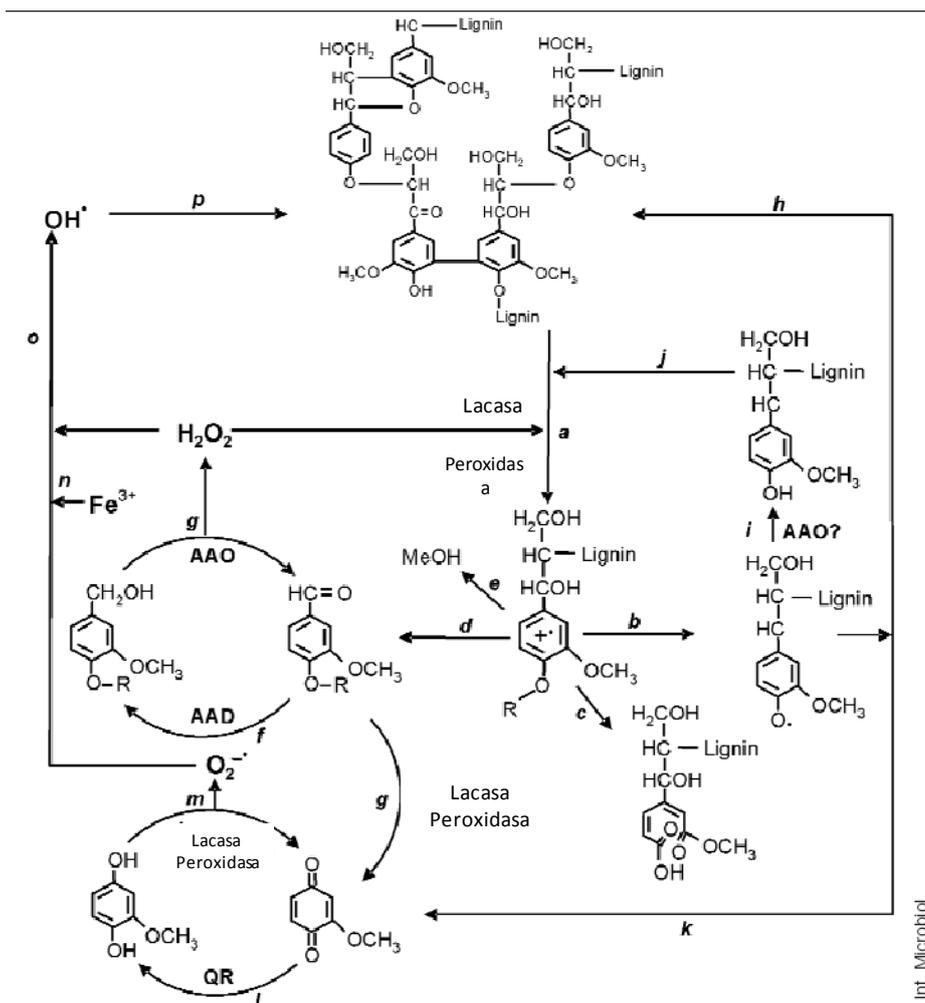


Figura 1.3: Esquema de la degradación de la lignina. (Tomado de Martínez *et al.*, 2005)

Las peroxidasas y las lacasas producidas por los hongos de la podredumbre blanca oxidan el polímero de lignina, generando radicales aromáticos (a), que son el punto de partida para una serie de reacciones no – enzimáticas. Estas reacciones pueden ser: ruptura en el C4 éter (b), ruptura del anillo aromático (c), ruptura Cα- Cβ (d) y demetoxilación (e). Los aldehídos aromáticos que surgen de la ruptura Cα- Cβ de la lignina o que son sintetizados *de novo* por el hongo (f y g) son el sustrato para las AAO que generan H₂O₂ en un ciclo de reacciones redox que involucran también las AAD. Los radicales fenoxi de la ruptura del C4 éter, pueden polimerizar nuevamente la lignina (h) si no son primero reducidos por oxidasas a compuestos fenólicos (i). Los compuestos fenólicos formados pueden ser reoxidados por lacasas y peroxidasas (j). Los radicales fenoxi pueden sufrir ruptura Cα- Cβ (k), produciendo p- quinonas. Las quinonas (g y/o k) contribuyen a la activación del oxígeno en reacciones cíclicas redox, en las que participan lacasas, peroxidasas y QR (l,m). Esto reduce el ión férrico de la madera (n), ya sea por el radical catiónico peróxido o directamente por el radical semiquinona, y su reoxidación con la concomitante reducción de H₂O₂ a radicales libres hidroxilo (OH[•]) (o). OH[•] es un oxidante muy fuerte que puede iniciar el ataque a la lignina en los estados iniciales del proceso de deterioro cuando el pequeño tamaño de los

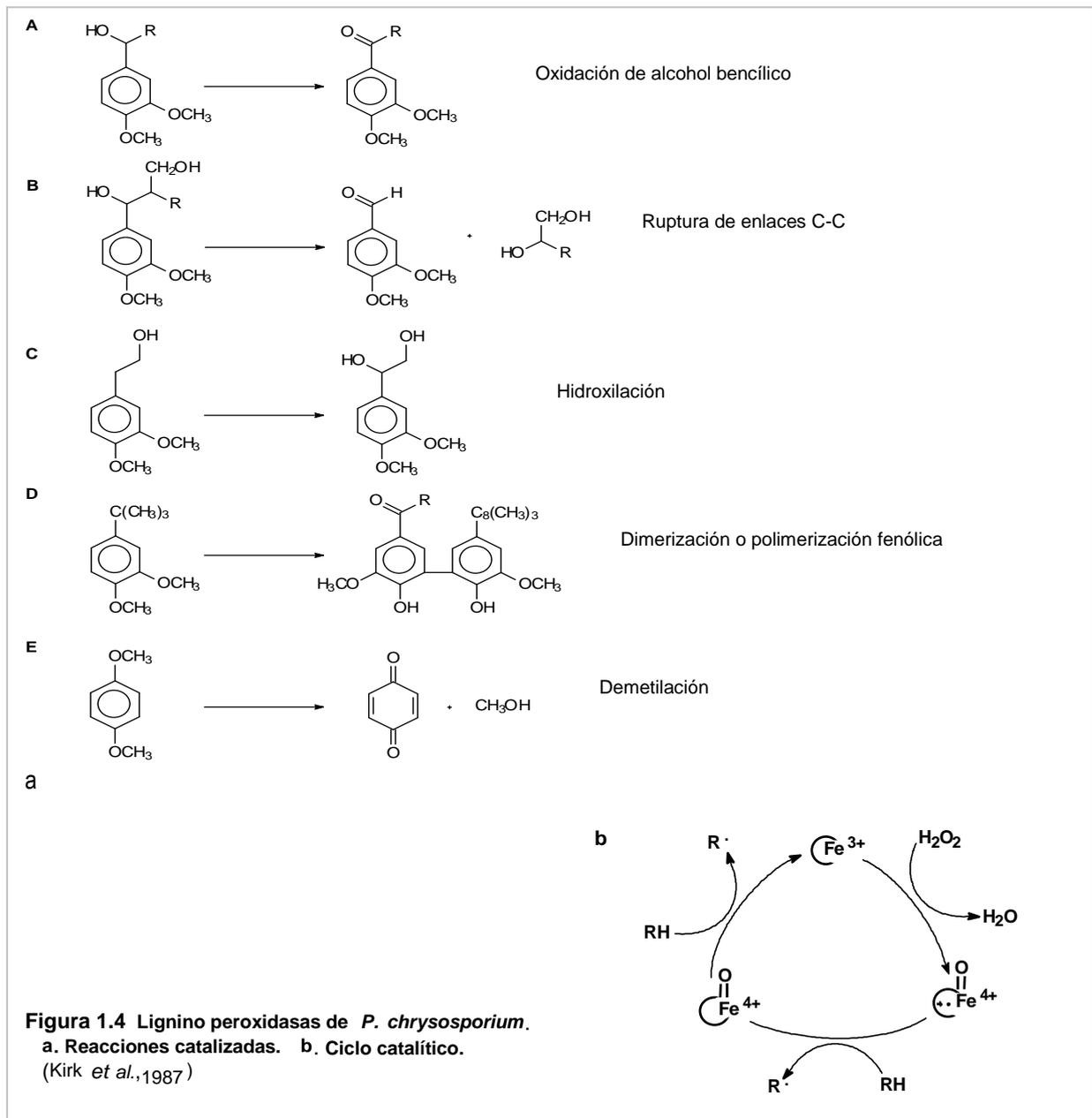
poros surgidos de la ultraestructura de la pared celular aún intacta, evita la penetración de las enzimas (Martínez *et al.*, 2005). En las etapas finales del proceso de degradación los productos simples, de menor peso molecular entran en las hifas fúngicas y son incorporados en las rutas metabólicas intracelulares.

Las características y el modo de acción de las enzimas se describen a continuación:

Fenol oxidasas (lacasas): son polifenol oxidasas glicosiladas con contenido de cobre variable, monoméricas o multiméricas. Presentan bajo potencial redox lo que les permite la oxidación directa de las subunidades fenólicas de la lignina por ruptura de enlaces éter β -0-4 y de compuestos de bajo potencial redox. Por lo que participan en la depolimerización mediante la eliminación de unidades simples de los grupos hidroxilo fenólicos libres terminales (Morohoshi, 1991). Su ciclo catalítico involucra varios intermediarios enzimáticos y un total de cuatro electrones son donados por los compuestos fenólicos que actúan de sustratos (Lundell *et al.*, 2010). Varias isoenzimas son codificadas por un gran número de genes, algunos de los cuales se expresan constitutivamente y otros son inducibles, de acuerdo a las condiciones ambientales (Collins & Dobson, 1997).

Lignino peroxidadas (LiP): son hemogloboproteínas monoméricas con un peso molecular de 42 KDa, que existen en por lo menos 8 isoformas. Su Fe (III) está pentacoordinado a cuatro nitrógenos hemo tetrapirrólicos y a un residuo de histidina. Catalizan varias reacciones que pueden clasificarse en cinco categorías: oxidación de alcohol bencílico, rotura de enlaces C-C, hidroxilación, dimerización o polimerización fenólica y demetilación (figura 1.4a).

El mecanismo de oxidación del sustrato es esencialmente peroxidativo (figura 1.4b, Kirk *et al.*, 1987). Su ciclo catalítico comienza con la reacción del sitio activo de la enzima, a través de su Fe^{3+} con el peróxido de hidrógeno. Esto reduce el peróxido a agua y oxida por dos electrones de la proteína férrica a un intermediario denominado compuesto I. El intermediario posee dos equivalentes reductores, un centro oxiferril [$\text{Fe}^{3+} = \text{O}$] y un radical π - catiónico. Luego el compuesto I se reduce mediante un electrón al compuesto II, a la vez que oxida una molécula de sustrato (RH) que forma un radical libre R \cdot . Finalmente el compuesto II es reducido por un electrón de una segunda molécula de sustrato reductor a la forma nativa de la enzima, con Fe^{3+} . El radical libre continuará participando en varias reacciones (Kirk *et al.*, 1987). Las LiP se diferencian de otras peroxidadas por su alto potencial de óxido – reducción, que le permite oxidar directamente compuestos aromáticos no – fenólicos, que son la mayor parte de las unidades de la lignina (Tien, 1988), siendo inespecíficas en sus sustratos reductores. La enzima glucosa oxidasa ha sido identificada como la fuente primaria de producción de peróxido de hidrógeno en cultivos degradadores de lignina en todas las fases del cultivo. La enzima extracelular glioxal oxidasa es una fuente importante de peróxido de hidrógeno durante la idiofase (Vyas *et al.*, 1994; Vyas *et al.*, 1995).



Manganeso peroxidasas (MnP): son hemogloboproteínas con un peso molecular entre 43-49 KDa. El rol principal de estas peroxidasas está relacionado con: 1) la oxidación de Mn(II) a Mn(III), el cual se une a un ligando apropiado, difunde desde la enzima y oxida sustratos fenólicos; 2) la generación de peróxido de hidrógeno a través de la oxidación de NADH, el cual será utilizado tanto por la lignino peroxidasa como por la manganeso peroxidasa (Élisashvili, 1993). La actividad de esta enzima depende de la presencia de ácidos dicarboxílicos y α -hidroxi, oxalato y lactato, esenciales para estabilizar los iones Mn(III) a altos valores de potenciales redox y facilitar la disociación y consecuente difusión de Mn(III) del complejo enzimático (Élisashvili, 1993). El ciclo catalítico es esencialmente el mismo que para las LiP. Actúa sobre los sustratos de manera indirecta por acción del ión Mn^{3+} que se forma en una serie de pasos. La enzima reacciona primero con el peróxido de hidrógeno a través de su Fe^{3+} y se oxida a un

compuesto I, el cual se convierte rápidamente en un compuesto II por oxidación de un equivalente de Mn^{2+} que pasa a Mn^{3+} . Una segunda unidad de Mn^{2+} reduce al compuesto II a la forma nativa (Fe^{3+}) y genera otro ion Mn^{3+} . El Mn^{3+} formado oxida los sustratos fenólicos. La enzima utiliza el par Mn^{2+} / Mn^{3+} capaz de difundir libremente, como par redox obligatorio para oxidar sustratos fenólicos terminales de la lignina (del 10-15% de los grupos fenólicos de la lignina) (figura 1.5, Kirk *et al.*, 1987).

En resumen, LiP y MnP poseen un alto potencial redox; LiP degrada unidades de lignina no - fenólicas, mientras que MnP al generar Mn^{3+} , que actúa como difusible, oxida unidades de lignina tanto fenólicas como no - fenólicas vía reacciones lipídicas peroxidativas.

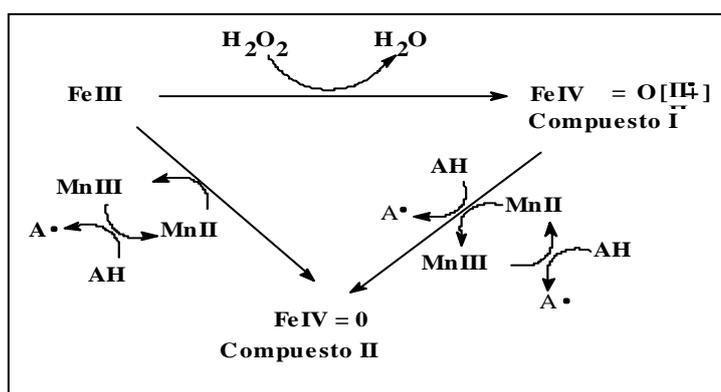


Figura 1.5 Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium*.

Peroxidasas versátiles (VP): son peroxidasas difíciles de clasificar por presentar tanto actividad LiP (oxidación de alcohol veratrílico y acción sobre fenoles) como actividad MnP (oxidación de Mn^{2+}), que se describieron en *Pleurotus eryngii* (Larrondo *et al.*, 2007) y ahora también fue encontrada en *Bjerkandera adusta* y basidiomicetes de la especie *Trametes* (Ruiz Dueñas *et al.*, 2009).

Los hongos de la podredumbre blanca de la madera, considerados en nuestro estudio son *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens*.

2.3 *Phanerochaete chrysosporium* como modelo

Phanerochaete chrysosporium pertenece a la División Basidiomycotina, Orden Aphyllophorales y Familia Corticiaceae. Es el organismo degradador de lignina más estudiado a la fecha. Fue descrito inicialmente por su estado anamórfico *Sporotrichum pulverulentum* (Burdall, 1974). El descubrimiento del estado teleomórfico, cambió el nombre de la especie a *Phanerochaete chrysosporium*. Su capacidad de degradar sustancias recalcitrantes tanto en medios químicamente definidos como en sustratos complejos, así como el presentar una tasa de crecimiento alta a temperaturas de 20 a 37°C y la propiedad única de crecer a 40°C, lo han convertido en el organismo modelo de elección para el estudio de las bases genéticas de la actividad ligninolítica. Por otra parte, el hecho de producir conidios simplifica ciertas

técnicas de siembra, de construcción de mutantes y de cruzamientos entre cepas (Burdvall *et al.*, 1974; Reader *et al.*, 1988; Castillo, 1997). Contiene en el micelio vegetativo 2 núcleos haploides (dicariosis) y cada uno contiene 7 o 9 cromosomas.

Fue el primer genoma de basidiomycetes secuenciado y se dispone de su secuencia completa en la base de datos JGI (<http://genome.jgi-psf.org>) (hasta el momento se han secuenciado y publicado 62 especies fúngicas de las cuales 6 son basidiomycetes). En los últimos años se han analizado detalladamente los datos de su genoma (Martinez *et al.*, 2004; Larrondo *et al.*, 2007; Kersten & Cullen, 2007); las 300 Mb del genoma están distribuidas en 383 *scaffolds* no mayores a 2 kb.

Presenta familias de genes estructuralmente relacionados, que pueden codificar proteínas con pequeñas diferencias en su función, siendo tal diversidad necesaria para enfrentar los cambios en las condiciones ambientales variables (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.), composición y accesibilidad del sustrato y especie de madera colonizada. Un ejemplo son las familias que incluyen los genes relacionados a hemo peroxidasas (LiP, MnP, multi Cu oxidasas, AAO, glioxaloxidasas) ya mencionadas y las celulasas. Muchos de estos genes están diferencialmente regulados en respuesta a la composición del sustrato (Larrondo *et al.*, 2007).

Las enzimas del sistema ligninolítico de *P. chrysosporium* corresponden a dos familias de hemo peroxidasas extracelulares, lignino peroxidasas (LiP) y manganeso peroxidasas (MnP) (Tien *et al.*, 1983; Kuwahara *et al.*, 1984). Se han identificado diez genes *lip* (*lipA*, ..., *lipJ*) que codifican isoenzimas lignino peroxidasas que tienen una alta similitud de secuencia entre ellas y su estructura cristalográfica muestra un importante solapamiento con la estructura de la citocromo C peroxidasa. La presencia de varias isoenzimas con distintos potenciales de oxidación junto con la amplia especificidad de sustrato confiere la capacidad de degradar ligninas de diferentes estructuras (Ollikka *et al.*, 1993; Elisashvili, 1993). A excepción de *lipC* y *lipI*, los genes *lip* están agrupados (Reader *et al.*, 1989; Gaskell *et al.*, 1994). La regulación transcripcional de por lo menos cinco de estos genes (*lipA*, ..., *lipE*) ha sido estudiada en profundidad (Holzbaur *et al.*, 1988; James *et al.*, 1992; Ritch & Gold, 1992; Stewart *et al.*, 1992; Reiser *et al.*, 1993; Stewart & Cullen, 1999). Los genes *lipD* y *lipE* se expresan preferencialmente en condiciones de carencia de carbono mientras que el gen *lipC* es inducido por limitación de nitrógeno y *lipA* es afectado tanto por nitrógeno como carbono. Esta familia de genes es también, particularmente dependiente de la presencia de altas concentraciones de oxígeno (Rothschild *et al.*, 1995, Rothschild *et al.*, 1999).

Al igual que las lignino peroxidasas, las manganeso peroxidasas (MnPs) constituyen una familia tanto a nivel de proteínas como a nivel de los genes que las codifican (*mnp1*,*mnp5*) siendo su estructura cristalográfica similar a la de las primeras. Los genes *mnp1*, *mnp2* y *mnp3* han sido extensamente caracterizados (Pease *et al.*, 1989; Godfrey *et al.*, 1990; Mayfield *et al.*, 1994; Alic *et al.*, 1997). La expresión de estos genes es inducida por la depleción de fuente de nitrógeno y la presencia del ión Mn^{2+} (Brown *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995; Gettemy *et al.*, 1997; Gettemy *et al.*, 1998). Finalmente, los genes *mnp4* y *mnp5* fueron identificados a partir de la secuenciación del genoma. *mnp4*

se ubica próximo a *mnp1*, y en la región intergénica *mnp1* – *mnp4* el gen del citocromo P450. Las proteínas predichas son casi idénticas ya que difieren en un único aminoácido (Martinez *et al.*, 2004). *mnp4* es activamente transcrita cuando *P. chrysosporium* crece sobre madera en suelo (Stuardo *et al.*, 2004). *mnp5* corresponde a la secuencia de aminoácidos N- terminal de una MnP purificada que coloniza pulpa de madera (Martinez *et al.*, 2004).

La secuencia parcial de una *mnp* de 274 nt, denominada *mnp6*, localizada a 85 kb de *mnp5* (*scaffold* 9) fue amplificada y secuenciada (Larrondo *et al.*, 2007). Presenta una alta homología (65%) entre los aminoácidos 299 a 370 de MnP5. No encontraron evidencia de la transcripción de *mnp6* pero si un codón *stop* en la mitad de su secuencia; se supone que es inactiva y el producto de una recombinación aberrante.

Respecto a la capacidad de generar lacasas, inicialmente se demostró la actividad lacasa en *P. chrysosporium* a partir de ensayos en placa y determinaciones espectrofotométricas. Trabajaron en medios definidos con baja y alta concentración de nitrógeno y con celulosa como fuente de carbono (Srinivasan *et al.*, 1995). Posteriormente se demostró a partir de los estudios genómicos, que *P. chrysosporium* no tiene la capacidad de generar lacasas, tampoco da la reacción de Bavendam². A la vez identifican cuatro genes *mco* (multi cobre oxidasa) con secuencias de excreción que codifican proteínas con actividad del tipo ferroxidasas, lo que permitió postular que estas proteínas son las responsables de la actividad oxidativa extracelular, en sustitución de la lacasa (Larrondo *et al.*, 2003).

2.4. *Punctularia atropurpurascens* completa el estudio

P. atropurpurascens pertenece a la División Basidiomycotina, Orden Aphyllophorales y Familia Corticiaceae. Es productor de atroconidias, con temperatura de crecimiento entre 20 y 37 °C y es nativo de la región, existiendo solo una cepa en colecciones internacionales (ATCC 36736), que fue aislada en La Plata (Argentina). La cepa utilizada en este trabajo (H2126) posee gran capacidad para decolorar los colorantes Remazole Brilliant Blue y Poly R- 478 y una buena velocidad de crecimiento a 30°C.

El sistema ligninolítico de *P. atropurpurascens*, es diferente al de *P. chrysosporium* respecto a las enzimas que posee y a la fase de crecimiento en que se producen. En estudios previos se analizaron el perfil de producción de enzimas a través de medidas de actividad enzimática por métodos espectrofotométricos y decoloración de colorantes, los perfiles de temperatura y pH óptimos para MnP y lacasa y los geles de poliacrilamida provenientes de ensayos de electroforesis de los extractos enzimáticos. Estos estudios indican que presenta dos lacasa y una MnP, pero no hay indicios de la presencia de LiP en las condiciones de cultivo ensayadas. La producción de lacasas ocurre después de detectar la producción de MnP en condiciones correspondientes al metabolismo primario, lo que indica

² Reacción de Bavendamm: reacción oxidativa con desarrollo de color característico de las fenol oxidasas extracelulares (lacasas) sobre sustratos fenólicos.

una diferencia en el sistema ligninolítico de este hongo respecto a otros (Alborés, 2002). Generalmente, las lacasas acompañan el metabolismo primario mientras que las MnP se han observado estrictamente durante el metabolismo secundario (Srinivasan *et al.*, 1995), si bien las lacasas pueden producirse tanto en el metabolismo primario como secundario (Vyas *et al.*, 1994).

Otra característica a considerar es que la variación de la velocidad de producción de lacasas acompaña a la variación de la velocidad de crecimiento, en tanto que la velocidad de producción de MnP es mayor (Alborés, 2002). Por su capacidad de decolorar los colorantes poliméricos sobre sustrato sólido y en medio líquido se considera que presenta un sistema ligninolítico completo (Spadaro *et al.*, 1992; Cookson, 1995) y es capaz de degradar selectivamente la lignina de *Pinus radiata*, sin afectar los componentes polisacáridos (Ferraz *et al.*, 2001). Extractos libres de células fueron capaces de decolorar soluciones al 0,1% de Remazole Brilliant Blue al cabo de 24 horas a 37°C. La caracterización enzimática del sistema ligninolítico de *P. atropurpurascens* demuestra que es capaz de degradar la lignina a través de las enzimas MnP y lacasa, del mismo modo que *Lentinula edodes*, *Rigidoporus lignosus*, *Dichomitus squalens* y *Ceriporiopsis subvermispora* (Tomsovsky *et al.*, 2009) hongos de la podredumbre blanca de la madera que han sido caracterizados.

P. atropurpurascens fue incluida en este estudio por presentar las mismas ventajas en cuanto a velocidad y condiciones de crecimiento que *P. chrysosporium* pero con un sistema ligninolítico diferente y por ser una especie que se encuentra en la región.

3. PRESERVACION DE LA MADERA: POR QUÉ ENSAYAR SOLUCIONES DE Zn y Mn COMO CONSERVADORES

En Uruguay, como en el resto del mundo, se busca prolongar al máximo la vida útil de la madera, utilizada en construcciones y productos derivados por medio de tratamientos de preservación que eviten su deterioro, en particular en maderas de durabilidad natural media o baja. La preservación de la madera se realiza introduciendo compuestos químicos estables dentro de su compleja estructura lignino - celulósica para evitar que ésta sea atacada por microorganismos y/o insectos. Los productos empleados son tóxicos para estos organismos, pero una vez fijados en la madera no deben ser peligrosos para el hombre ni el medio ambiente, ni afectar las propiedades tecnológicas de la madera.

En la actualidad el producto más utilizado a nivel industrial es el denominado "CCA", conservante de madera en base a Cr, Cu y As. Este producto, de eficacia comprobada, garantiza la conservación de la madera por decenas de años y se ha impuesto frente a otros no obstante lo cual su uso ha sido prohibido en la Unión Europea y Estados Unidos para ciertos usos, mientras que en Japón y Dinamarca la prohibición es total, siendo fuertes las presiones para generalizar esta prohibición. Los inconvenientes más importantes que presenta son de orden ambiental, sobre todo por la presencia de As, siendo sumamente difícil disponer en forma segura tanto de los residuos del procesamiento de la madera como las maderas fuera de uso.

En los últimos 20 años el uso de la mayoría de los biocidas de amplio espectro, no solo el CCA, está siendo limitado por contener componentes químicos que son potencialmente tóxicos a los organismos que no son su objetivo (Kartal *et al.*, 2004). Es una prioridad para la industria en el mundo, desarrollar investigaciones que conduzcan a preservantes para madera de producción, manejo y aplicación seguros, cuyos efectos sobre el ambiente estén controlados (Eaton & Hale, 1993). En base a estas consideraciones y a la aplicación de legislaciones nuevas, exigencias ambientales, de seguridad y salud ocupacional, existe un incentivo en la búsqueda de nuevos conservadores para madera alternativos a los biocidas de amplio espectro y, en lo posible de bajo costo. Sobre todo para aquellos usos en que la madera no necesite conservarse por largos períodos, por ejemplo en invernáculos, construcciones de madera en contacto con alimentos u otros requisitos ambientales que impidan el uso de productos de amplio espectro.

La respuesta a ¿por qué ensayar soluciones de Zn y Mn como conservadores para madera? es el desarrollo en nuestro país de un proceso que permite el reciclado de pilas domésticas usadas, comunes y alcalinas que tiene como producto principal una solución rica en zinc, que posee además manganeso en una relación 2:1. Como el éxito de un proceso de reciclado se puede medir a través del uso de los productos que surgen del mismo, se han ido analizando alternativas viables de aplicación de los productos. El primer uso de esta solución es su incorporación en el proceso de fabricación de fertilizantes por su aporte en micronutrientes (Zn, Mn acompañados de sales de potasio y amonio); es un

uso de volumen limitado a decenas de toneladas anuales. Estudiar su aplicación como conservador para madera, abre una segunda posibilidad de aplicación para dicha solución, con una continuidad definida por la creciente forestación del país.

Es importante tener en cuenta que las sales de Zn y Mn, sobre todo las primeras, han sido utilizadas como conservantes de madera, incluso a nivel industrial en otras épocas y siguen siendo usadas en la actualidad a nivel de establecimientos productivos pequeños por ascensión simple por capilaridad. El cloruro de zinc fue el primer preservante para madera a base de zinc patentado en 1838 por Sir William Burnett. Inicialmente se impregnaba la madera por inmersión en las soluciones de la sal en tanques abiertos. En 1847, se desarrollaron los procesos de impregnación a presión (tratamiento de Burnett), que retardan el efecto de la lixiviación de los metales cuando la madera en uso se encuentra expuesta a climas más o menos húmedos. A partir de 1879, se empleó el cloruro de zinc combinado con gomas, ácido tánico, creosota. Se consumieron millones de toneladas por año hasta el final de la primera Guerra Mundial, cuando aumentó la disponibilidad de la creosota a un costo reducido. Paralelamente se desarrollaron y se consumieron en menores cantidades, otros conservadores para madera en base a zinc: acetato de zinc, arsenito-meta-zinc (ZMA), sulfato de zinc, cloruro de zinc cromado cuperizado (CuCZC), arsenato de zinc cromado (CZA) que ha sido el más usado. En 1933 es patentado el primer preservante de tipo CCA y a partir de allí comienza el empleo a nivel mundial del Cu como metal principal en los conservadores para madera (Hunt *et al.*, 1967; Hartford, 1973).

No se ha encontrado evidencia de que el abandono del zinc, haya sido por falta de eficiencia como funguicida, sino debido a razones puramente comerciales. En un estudio comparativo sobre preservantes de madera que realiza el Forest Products Laboratory, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos que comienza en 1938, con varios informes de evaluación (1995 y 2000) los productos en base a zinc presentan una eficiencia similar a aquellos formulados con cobre (Gutzmer *et al.*, 1995; Crawford *et al.*, 2000). Actualmente existe en el mundo un aumento de interés por el zinc, sus sales y óxidos, como antimicrobiano. En agosto de 2004, la empresa International Coatings Inc. registró su producto Micron 66 como preservante de madera, conteniendo sales y óxido de zinc (August 2004, Products Approved via HSE Biocides and pesticides unit). Asimismo, ICI presenta varios productos con zinc como preservantes de madera (<http://www.gaps.cornell.edu/pubs>). En India, se ha estudiado un producto en base a zinc, cobre y boro, todos agentes bacterio y fungistáticos, donde cada componente tiene un efecto sinérgico respecto a los otros; en los estudios preliminares de su desarrollo este producto ha demostrado alta eficiencia (Tripathi *et al.*, 2005).

4. Zn²⁺, Mn²⁺ Y LOS BASIDIOMYCETES: ANTECEDENTES.

Numerosos estudios muestran que los metales influyen en la fisiología de los basidiomycetes de varias maneras que van desde la germinación de conidios (Rózycki, 1992) hasta las reacciones individuales y los procesos metabólicos complejos (Baldrian, 2003). En este último caso para causar una respuesta, los metales del ambiente debe ser tomados por el microorganismo y una vez allí producen inhibición o estimulación del crecimiento, alteración en la generación de enzimas intracelulares y/o extracelulares producidas tanto en el metabolismo primario como secundario; en algunos casos los cambios en los procesos fisiológicos son tan severos que llegan a ser letales para el organismo (Gabriel *et al.*, 1996; Falih, 1997; Hatvani *et al.*, 2003).

La toxicidad de los metales (esenciales y no esenciales) frente a los basidiomycetes varía de acuerdo al organismo, a las propiedades físico – químicas del metal presente y a factores ambientales (Gadd, 1993). Su efecto se analiza como un complejo de procesos fisiológicos relacionados directamente a la habilidad del hongo para colonizar el sustrato, para desarrollarse en el ecosistema y para explotar los recursos disponibles. El estado nutricional y metabólico del organismo influye, ya que un ambiente pobre en nutrientes limita los mecanismos directos o indirectos de tolerancia y/o resistencia, aumentando la toxicidad de los metales (Gadd *et al.*, 2001). Las distintas especies de hongos, distintas cepas de la misma especie, cepas que difieren en su estado de crecimiento e incluso diferentes formas reproductivas y vegetativas del mismo organismo, difieren en los mecanismos de protección involucrados frente a los metales y en consecuencia difieren en su sensibilidad hacia los metales.

Los principales antecedentes bibliográficos están centrados en el cobre, el fungicida metálico más conocido y empleado. Sus propiedades fungicidas son conocidas, dependen de la afinidad del ión Cu²⁺ por diferentes grupos químicos en la célula, especialmente los grupos tioles, lo que produce una desnaturalización no específica de las enzimas y otras proteínas. En particular interfiere con la actividad del sistema piruvato deshidrogenasa, inhibiendo la conversión de piruvato a acetil CoA dentro de la mitocondria (Eaton & Hale, 1993). Estos mecanismos junto a la tolerancia al cobre de ciertos hongos descomponedores de madera se han investigado ampliamente para el desarrollo de nuevos preservantes para madera y fungicidas en general y para la biorremediación de maderas tratadas fuera de uso, de suelos contaminados o efluentes industriales (Guillén & Machuca, 2008). También se destaca el efecto inductor del cobre sobre la producción de lacasa, ya que es regulada a nivel transcripcional por este metal en numerosos basidiomycetes (Baldrian, 2003). El resto de la información bibliográfica se ocupa de metales que son contaminantes ambientales peligrosos como Cd, Pb, Ni, etc, que se encuentran en general acompañando a xenobióticos que pueden ser muchas veces degradados por los hongos de la podredumbre blanca en procesos de biorremediación. Para estos usos se ha profundizado en el estudio de la bioacumulación de los metales por los hongos. Pero son muy escasos los estudios disponibles que se ocupen del Zn como agente fungicida, encontrándose fundamentalmente datos respecto a su bioacumulación.

El zinc es esencial para el crecimiento y participa en muchos procesos celulares del metabolismo primario y secundario. Es cofactor de aldolasas, algunas deshidrogenasas, la superóxido dismutasa, así como es esencial en muchas enzimas reguladoras de la expresión génica. Recientemente se ha descrito que el Zn, participa en los mecanismos de protección contra la muerte celular programada (apoptosis); pero la deficiencia o el exceso de zinc pueden resultar en apoptosis, en particular cuando esta es inducida por agentes tóxicos como el Cd presente en el ambiente. Sucede lo mismo con respecto a las enzimas de los sistemas de defensa celular contra las especies reactivas del oxígeno. Cuando está en exceso aumenta el estrés oxidativo lo que lo convierte en citotóxico (Collins-Hansen *et al.*, 2005).

Se conocen rangos de concentraciones de Zn que afectan el crecimiento de varios basidiomycetes en distinto grado que a la vez varía con las condiciones de cultivo (Falih, 1996; Hatvani *et al.*, 2003; Baldrian, 2003). La concentración óptima de zinc para el crecimiento es de 0,6 μM , denominado nivel basal de zinc para *P. chrysosporium* (Singhal *et al.*, 2001). A muy bajas concentraciones (0.006 – 0.018 μM el Zn) el Zn estimula el crecimiento y la actividad de las enzimas LiP y MnP de *P. chrysosporium* (Singahl *et al.*, 2001). En general una concentración menor a 0,5 mM de Zn en *P. chrysosporium* estimula la producción de biomasa hasta un 165% respecto al control y específicamente 0,25 mM de Zn aumenta solo 10% respecto al control (Pointing *et al.*, 2000). Sin embargo, se produce una inhibición total del crecimiento de *P. chrysosporium* a concentraciones de Zn de 1,0 mM, mientras especies como *Pycnoporus sanguineus* son inhibidas a 0,1 mM en Zn.

El promedio del contenido de Zn en hongos terrestres es cerca de 100 $\mu\text{g/g}$ peso seco; esta concentración es relativamente alta respecto a otros metales (Gabriel *et al.*, 1997). Puede ser bioacumulado hasta ciertos límites de concentración que varían con el organismo; luego del rango óptimo, se convierte en tóxico y finalmente letal (Turpeinen, 2002). Especies fúngicas como *Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum*, *Fomitopsis pinicola* y *Schizophyllum commune*, bioacumulan Zn encontrándose entre 10 y 160 $\mu\text{g/g}$ en muestras extraídas de áreas contaminadas y un contenido mayor (entre 15 y 241 $\mu\text{g/g}$) en muestras provenientes de áreas no –contaminadas. La diferencia en el contenido de Zn de las muestras de zonas no contaminadas, comparada con zonas contaminadas, se debe a un efecto sinérgico de otros metales presentes en el medio. In vitro, *Pycnoporus cinnabarinus*, es capaz de acumular mayor cantidad de Zn en presencia de soluciones equimolares de Zn, Cd, Hg, Pb y Cu que cuando solo hay solución de Zn en el medio. Pero otras especies como *Pleurotus ostreatus*, *Daedalea quercina*, *Trametes versicolor* acumulan más Zn cuando es el único metal en el medio. En general ocurre que el Zn que forma parte de las biomoléculas del microorganismo, es reemplazado por otros metales, cuando el hongo está en crecimiento en contacto permanente con los metales (Curdová *et al.*, 2004). La capacidad de bioadsorción del Zn es utilizada para su remoción de efluentes cuando está en baja concentración, a través de los bioadsorbentes inmovilizados en reactores. Por ejemplo micelio de *Trametes versicolor*, fue inmovilizado en carboximetilcelulosa; presentó una capacidad de absorción de 1,33 mmol de Zn^{2+} por gramo de bioadsorbente seco (Wang *et al.*, 2009).

El manganeso también es un elemento esencial y participa en el proceso de degradación de la lignina. En el caso del *P. chrysosporium* como ya se indicó, funciona en el control regulatorio de varias proteínas durante el metabolismo secundario, como por ejemplo las lignino peroxidadas y las manganeso peroxidadas. Las primeras son formadas casi exclusivamente a bajas concentraciones de manganeso (1,6 ppm) y reprimidas a altas concentraciones del mismo (40-199 ppm), ocurre lo contrario con la producción de manganeso peroxidadas. Sin embargo concentraciones intermedias del metal (11ppm) permiten la formación de ambas enzimas. Poco se conoce respecto a la bioacumulación de manganeso. Se afirma que los hongos que producen pudrición blanca creciendo sobre madera en ambientes naturales no bioacumulan Mn (Baldrian, 2003). En el anexo A se presenta información toxicológica sobre ambos metales, así como una comparación entre la toxicidad del Zn y el Cu (elemento fungicida, ampliamente usado).

El efecto sobre el crecimiento, la inducción de cambios morfológicos, de cambios metabólicos como la supresión de determinada actividad enzimática, varía en presencia de un solo ión metálico en el medio, o por la presencia simultánea de varios iones metálicos debido al posible efecto sinérgico o antagónico de los metales sobre los hongos (Yonni *et al.*, 2002).

Efectos sobre la actividad enzimática

Los metales pesados presentes en el ambiente interactúan directamente con las enzimas extracelulares del hongo; estas enzimas deben enfrentar altas concentraciones metálicas, ya que no están protegidas por los mecanismos de detoxificación metálica asociados a la célula (Baldrian, 2003). En consecuencia las enzimas pueden ser inactivadas a través de mecanismos ya mencionados como: modificaciones de su sitio activo, bloqueo del grupo funcional o por desplazamiento del metal esencial que tenga.

Dentro de la célula, los metales pueden producir la inactivación enzimática por los mecanismos ya mencionados a lo que se suma la capacidad de regulación de la expresión génica así como efectos a nivel traduccional y post traduccional. Es sabido que los genes que codifican estas enzimas en *P. chrysosporium* presentan una compleja regulación por limitaciones de nutrientes (en particular nitrógeno), concentraciones de manganeso, agitación del cultivo, shock térmico y otros estrés químicos (Janse *et al.*, 1998). En particular, la expresión de las MnPs es controlada a nivel de la transcripción por nutrientes nitrogenados, en tanto que la actividad de la MnP es regulada por la presencia de Mn en el medio y su carencia regula la transcripción de los genes *mnp*. Los transcriptos de los tres *mnp*s están presentes a nivel basal en cultivos con suficiente nitrógeno en presencia o ausencia de Mn y en cultivos limitados de nitrógeno en ausencia de Mn. De las isoenzimas de MnP, *mnp3* no es regulada por Mn, en tanto que *mnp1* y *mnp2* son fuertemente reguladas por Mn, ya que los niveles de transcriptos de estas últimas,

aumentan luego del quinto día al agregar 180 μM en Mn a cultivos limitados de nitrógeno y agitado (Gettemy *et al.*, 1998).

Las regiones promotoras de los genes *mnp*s contienen secuencias cortas, elementos putativos que incluyen la caja CCAAT, MRE (*metal response elements*), HSE (*heat – shock elements*), XREs (*xenobiotic – response elements*), STRE (*stress –response elements*) y los sitios de enlace para la proteína activadora 2 (AP-2) (Ma *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los HSEs son fisiológicamente funcionales (Brown *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1993).

Los múltiples MREs de las regiones promotoras de los genes *mnp1*, *mnp2* y *mnp3* son idénticos a las secuencias cis-actantes responsables de la inducción por metales pesados de la expresión de los genes de las metalotioneinas (*mt*), exitiendo una similitud adicional en la regulación por Mn^{2+} de la transcripción de los genes (Brown *et al.*, 1991). Los promotores de los genes *mt* tienen múltiples copias de los MRE. Como ya se mencionó, el rol de las metalotioneinas en la protección contra la toxicidad de los metales correlaciona con la habilidad de varios iones metálicos como Zn, Cu, Cd y otros de activar la transcripción de genes *mt*. La regulación de los genes *mt* ocurre vía una proteína reguladora de metales que funciona como receptor del metal y como factor de transcripción (Faraco *et al.*, 2003). Se sabe que ratones y mamíferos en general presentan MREs funcionales, a los que se conoce su secuencia (Imbert *et al.*, 1989). Los MREs están presentes en múltiples copias no idénticas por gen y todos los elementos conocidos tienen la secuencia consenso de 7 nucleótidos (5'- TGCRNC-3') (Czupryn *et al.*, 1992; Faraco *et al.*, 2003). Por la similitud con las MTs, la presencia de otros metales pesados en el medio podría inducir los genes de la familia de las *mnp*s, a pesar de que en algunos hongos, no existe una correlación entre la activación por metales (por ejemplo Mn^{2+}) y la presencia de MREs.

Varios sitios MRE putativos han sido identificados en la región promotora de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Faraco *et al.*, 2003); mientras que en *Ceriporiopsis subversmispora*, cinco, tres y un MREs putativos han sido identificados en las regiones promotoras de *mnp1*, *mnp2* y *mnp3*, respectivamente (Manubens *et al.*, 2003). En *P. chrysosporium* se han identificado cinco secuencias de tipo MREs en la región promotora del gen *mnp1*, lo cual indica que posiblemente los metales actúen como elementos de control de la transcripción (Godfrey *et al.*, 1990; Gold *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 2000). Sin embargo no se ha demostrado aun su funcionalidad.

Trabajos previos atribuyen el hecho de que los genes *mnp*s estén diferencialmente regulados a nivel transcripcional en respuesta al Mn, a las diferencias en las regiones promotoras. Afirman que el promotor de *mnp3* carece de MREs; el de *mnp1* tiene dos pares de MREs putativos, en tanto que el de *mnp2* tiene un par (Gettemy *et al.*, 1998). La mencionada regulación diferencial de los genes *mnp*s por presencia de metales ha sido confirmada por la adición de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ y Cd^{2+} que incrementan los transcritos de *mnp1* y *mnp2*, más que a *mnp3*. La misma regulación diferencial de transcripción de los genes *mnp*s se ha observado en otros hongos de podredumbre blanca *T. versicolor*, *P. ostreatus*, *C. subversmispora*. El incremento en los niveles de mRNA es parcialmente abolido por la presencia de Mn^{2+} .

A pesar de esta regulación no hay una clara correlación entre los niveles de *mnp* ARNm y la actividad MnP; se observó que en ausencia de Mn^{2+} , se detectan transcritos de *mnp1* y *mnp2*, sin embargo no se detecta enzima MnP (Manubens *et al.*, 2003). El Mn^{2+} regula la transcripción de genes, pero no se sabe si afecta la estabilidad de los ARNm o presenta un rol adicional en los eventos post transcripcionales, ya que es necesario para la obtención de enzima activa en el medio extracelular una vez que se sintetizó el ARNm. El estrés oxidativo de *P. chrysosporium* conduce a una acumulación de ARNm de *mnp*, pero no a una producción de MnP extracelular, a menos que Mn^{2+} sea agregado.

Luego se han caracterizado fragmentos de la región promotora que contienen al menos un elemento cis de respuesta al Mn^{2+} , constituyendo el primer elemento de respuesta caracterizado en organismos eucariotas. Dicho fragmento promotor que regula la expresión de los genes *mnp1* por Mn, posee una secuencia de 33 bp, que presenta una fuerte homología con las secuencias promotoras de *mnp2* y *mnp3*. Esto sugiere que los elementos putativos de respuesta al Mn^{2+} están conservados dentro de los genes *mnp*. Se analizó la funcionalidad de dicho fragmento a través de un sistema reportero que emplea el gen de la proteína verde fluorescente (*egfp*); se examinaron los efectos de mutaciones, deleciones, reemplazo y traslocación en la región promotora del gen *mnp1* dirigidos a la expresión o no del gen *egfp* en cultivos con condiciones de suficiencia o deficiencia de Mn^{2+} . De los seis MRE putativos estudiados, ninguno estaba en dicha región y cuatro de los MRE no mostraron efecto significativo del gen en respuesta al Mn^{2+} (Ma *et al.*, 2004).

Influencia de las condiciones y composición del cultivo en la tolerancia a metales

Como ya se mencionó los parámetros de cultivo (composición del medio, el tipo de sustrato, condiciones ambientales y la formulación del preservante) influyen en la capacidad de enlazar metales por el hongo. Esta influencia se debe a que la pared celular juega un rol fundamental en la adsorción de metales, en particular sus capas más externas por medio de sus componentes (fundamentalmente polisacáridos), ya que la estructura de la pared varía en función de la composición del sustrato donde crece el hongo (Gadd, 1990). Esto fue demostrado con *pellets* de micelio de distintos basidiomycetes en presencia de cobre en el medio (Gabriel *et al.*, 2001). O sea que al variar la composición del medio de cultivo y con ello la capacidad de adsorción de los metales, varía la biodisponibilidad de los mismos, si bien en medios minerales este efecto es menor que en medios complejos.

Por otra parte, los parámetros del cultivo influyen en la producción enzimática ligninolítica de los hongos de pudrición blanca. Estos hongos producen peroxidasas, si se encuentran en un estado de metabolismo secundario, al que llegan por una limitación de nutrientes (C, N, ó S). Dichas limitaciones conducen a una disminución en los aminoácidos celulares transportados por los tARNs para construir péptidos, lo cual actúa sobre los genes del metabolismo secundario por una serie de señales celulares en cascada. Hoy es sabido que ésta no es la única causa ya que ejercen una regulación positiva sobre la

producción enzimática factores como temperatura, pH, agitación, la presencia en el medio de ácidos orgánicos, trazas de elementos, sus proporciones relativas y el oxígeno disuelto (Singh & Chen, 2008).

En particular la regulación por nitrógeno influye en la producción enzimática y en la producción de biomasa *in vivo*, lo cual depende del rol ecológico de los hongos descomponedores de madera como colonizadores primarios o secundarios: en el primer caso, se manejan con un escaso contenido de nitrógeno en el sustrato, mientras que en el segundo caso están en un ambiente con contenido creciente de nitrógeno debido a la biomasa muerta de los colonizadores primarios (Tomsovsky *et al.*, 2009). *In vitro* la producción enzimática está regulada por el bajo contenido de nitrógeno para hongos de pudrición blanca en general; sin embargo géneros como *Bjerkandera*, *Lentinus*, *Pleurotus* y *Ceriporiopsis* producen las enzimas en condiciones de C y N suficientes.

Para incrementar la producción de peroxidasas en *P. chrysosporium* se emplean: glucosa como fuente de carbono, tartrato de amonio como fuente de nitrógeno, pH mantenido entre 4,2 y 6,2, un rango de temperaturas de incubación entre 25 – 39 °C, cultivos en un rango de agitación desde el estacionario hasta unos 30 rpm y suplemento de oxígeno en los cultivos estacionarios. Para la descomposición de lignina y el crecimiento fúngico importan además los elementos trazas (calcio, manganeso, zinc, cobre, hierro, magnesio) y la tiamina como fuente de vitamina (Kirk *et al.*, 1978; Singh & Chen, 2008; Vanden Wymelenbers *et al.*, 2009).

Se han empleado fuentes nutrientes alternativas para producir peroxidasas: glicerol, extracto de malta, peptonas y diversos residuos lignocelulósicos; estimuladores de la producción y actividad de las peroxidasas: el alcohol veratrílico, el ión Mn^{2+} , el Tween 80 (aumenta la producción y protege las enzimas de la inactivación mecánica), polipropileno glicol, polietileno glicol (mejora actividad enzimática), queladores (malonato, lactato, oxalato, etc., mejoran actividad de MnP) (Singh & Chen, 2008). En cultivos sobre sustrato sólido madera, se detectó actividad MnP, y se verificó la expresión de los genes *mnps* (Sato *et al.*, 2007).

En el laboratorio las condiciones de cultivo que permiten optimizar la producción enzimática se combinan para desarrollar sistemas controlados donde estudiar, por ejemplo el efecto de factores ambientales como la presencia de metales en el medio sobre la expresión de los genes que codifican las enzimas ligninolíticas y su producción.

5. BASES PARA EL DESARROLLO DE UN FUNGUICIDA CON SALES DE Zn Y Mn:

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Para desarrollar nuevos conservadores para madera hay que tener en cuenta las exigencias que deben cumplir; por ejemplo ser específicos en su acción tóxica o sea tener baja toxicidad para mamíferos, permanecer efectivos por un tiempo razonable, que su principio activo pueda ser fijado para evitar su lixiviación, ser altamente penetrantes, presentar alta retención, inertes para la madera y los elementos de fijación, resistente al fuego, repelente a la humedad, pintables, económicos, seguros en el manejo y el uso.

La efectividad de un conservador depende en gran medida de su habilidad para ser tóxico sólo a los organismos que se alimentan o que viven dentro de la madera. El conocimiento de los mecanismos de toxicidad de un potencial funguicida es fundamental en el desarrollo de un conservador para madera. Considerando a los cationes Zn y Mn, como el principio activo frente a los hongos, este trabajo estudia la capacidad de la solución obtenida en el proceso de reciclado de pilas como conservador para madera. Para ello se analiza el efecto de dichos metales y la solución que los contiene (tanto sulfatos puros como la solución proveniente del reciclado) sobre dos parámetros de la fisiología de los hongos filamentosos que deterioran la madera: el crecimiento y el sistema enzimático ligninolítico. El efecto sobre el crecimiento se evalúa a través de la germinación de conidios y la velocidad de crecimiento micelial. En tanto que el efecto de los metales sobre el sistema ligninolítico en conjunto (MnP, LiP, Lac) se analiza por su capacidad para degradar colorantes poliméricos y sobre la actividad enzimática de cada enzima individual por determinaciones espectrofotométricas y a través de la expresión transcripcional de los genes *mnps* (primera etapa de la génesis de las MnP).

Dado que la sensibilidad a los metales varía entre especies, se seleccionaron para este estudio dos basidiomycetes descomponedores de madera que presentan distintos sistemas ligninolíticos: el *Phanerochaete chrysosporium*, que como ya se indicó es usado como modelo en muchas investigaciones de aplicaciones biotecnológicas y *Punctularia atropurpurascens*, una especie encontrada en la región.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es identificar los niveles fisiológicos a los cuales los metales Zn y Mn presentan actividad antifúngica. El trabajo está planteado en etapas: la sección 2 muestra la respuesta fisiológica de los microorganismos seleccionados, a la presencia de soluciones estándar puras de los sulfatos de Zn y Mn. La sección 3 se centra en el sistema MnP y estudia su regulación génica por medio de Zn y Mn. La sección 4 analiza los efectos de la solución obtenida a partir del proceso de reciclado de pilas sobre la fisiología fúngica. Se incluye además un ensayo de campo con probetas tratadas con la mencionada solución cuya efectividad es comparada con aquella de preservantes de referencia como el CCA. La comparación de los resultados de ambos capítulos, permitiría evaluar si la matriz en la que están inmersos los mencionados metales en la solución proveniente del reciclado, tiene una acción sinérgica o antagónica con respecto a ellos, potenciando o disminuyendo su efecto.

6. ESTRATEGIAS

El efecto de los metales (Zn y Mn) se evalúa a través de dos parámetros fisiológicos de los basidiomycetes en estudio, cada uno a distintos niveles: el crecimiento y el sistema ligninolítico.

El principal criterio de evaluación de eficacia de un potencial producto fungicida, es su capacidad de inhibir el crecimiento fúngico. En consecuencia se busca determinar la concentración metálica mínima capaz de inhibir la germinación de conidios y el crecimiento micelial (sobre medio nutriente y sobre madera). En muchas especies, la esporulación y la germinación de las esporas formadas son más sensibles a los metales que el crecimiento micelial. La germinación de las esporas asexuales o conidios que arriban a la madera, resulta en la formación de un tubo germinativo, seguido de la extensión de la hifa, su ramificación, etc, lo que constituye en muchos casos el primer paso en la colonización de la misma. Importa determinar la potencial interrupción de esta ruta de infección en la madera a través de un preservante. Se estudia cómo es afectada la germinación de conidios a distintas concentraciones metálicas, ya que la misma es influida por las condiciones ambientales, en particular la composición química del medio. Suspensiones conidiales de cada hongo son expuestas a concentraciones metálicas crecientes e incubadas por 48 horas a lo largo de las cuales se observan al microscopio. Se determinan las concentraciones metálicas que inhiben la germinación.

El crecimiento micelial es el siguiente nivel evaluado. Se determina la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las soluciones metálicas (Zn, Mn, mezcla de ambas sales puras y solución proveniente del proceso de reciclado de pilas). La CIM es definida como la mínima concentración de solución que inhibe totalmente el crecimiento; es empleada como medida de la toxicidad de la solución (Hadacek & Greger, 2000). Se sigue la evolución del diámetro del micelio en la placa cuyo medio de cultivo nutriente (agar – malta), contiene distintas concentraciones de los metales (Borokhov & Rothenburger, 2000; Hadacek & Greger, 2000). Sin embargo este método rápido para evaluar la capacidad fungicida de los potenciales conservantes, omite las interacciones entre la madera, sustrato natural de los hongos y los metales, principio activo del potencial producto preservante. Además en la madera los hongos deben desarrollar sofisticados mecanismos para colonizarla y sobrevivir (Humar & Poloven, 2005). Por lo tanto en segundo término se determina el efecto de los metales sobre el crecimiento de los basidiomycetes sobre madera, a través de una serie de ensayos con probetas de pequeño tamaño (minibloques) tratadas con todas las soluciones en estudio y expuestas por cortos períodos de tiempo a los hongos. Solo en el caso de la solución proveniente del proceso de reciclado, se realiza el ensayo para determinar la mínima concentración de preservante que inhibe el crecimiento de basidiomycetes en madera aplicando la norma EN113:1996 que es más largo y costoso.

Analizada la potencial eficacia de los metales como preservantes, interesa conocer a qué nivel y de qué modo es afectado el sistema ligninolítico. La influencia de los metales sobre las enzimas ligninolíticas puede darse en distintas etapas de su génesis, desde la regulación de la expresión de sus

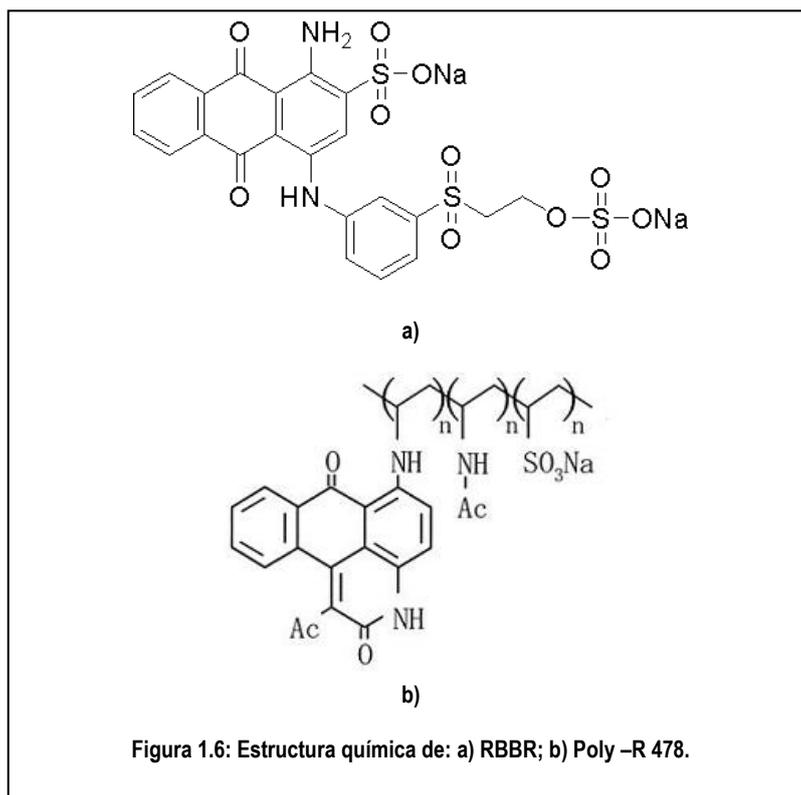
genes hasta la traducción, el plegado y la activación de las proteínas. Se analiza el efecto de los metales determinando la concentración metálica mínima con capacidad inhibitoria sobre la actividad enzimática ligninolítica extracelular global, vista a través de la decoloración de colorantes poliméricos; la actividad de cada enzima ligninolítica individual (MnP, LiP y Lac) determinada espectrofotométricamente; y sobre la expresión transcripcional sobre las peroxidasa manganeso dependientes.

La actividad de las enzimas ligninolíticas en conjunto (MnP, LiP, Lac), en presencia y ausencia de metales, se evalúa a través del método de *screening* de conservadores para madera desarrollado por Borokhov & Rothenburger (2000). En el mismo colorantes poliméricos son adicionados al medio de cultivo donde sufren un cambio de color debido a la actividad de las enzimas extracelulares de los basidiomycetes, que los degradan a través de reacciones redox. Este análisis permite discriminar aquellos compuestos que inhiben mecanismos bioquímicos específicos de aquellos que son simples toxinas metabólicas. La medida del efecto tóxico de los metales se determina a través de las CIMD, que es la concentración de solución mínima que produce inhibición total de la decoloración. No siempre existe equivalencia entre la CIMD y la CIM, si bien pueden estar correlacionadas.

Este método se basa en que la capacidad única de degradar lignina, viene dada por un sistema enzimático extracelular no específico y no estereoselectivo. Tener mecanismos de degradación no específicos les otorga a estos hongos la habilidad de degradar un amplio rango de contaminantes ambientales, tintas comúnmente empleadas en la industria, que presenten semejanza química estructural con la lignina o sus derivados (Hofrichter, 2002). Las estructuras químicas más comúnmente encontradas clasificadas por su cromóforos, que sirven de sustrato indicador de la actividad ligninolítica son azo, trifenilmetileno, antraquinona, heterocíclicos/ poliméricos (Levin *et al.*, 2004).

En general los colorantes poliméricos son solubles en agua y exhiben baja o nula toxicidad para los microorganismos. El RBBR (fórmula $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$, peso molecular 626.54) es uno de los colorantes más importantes de la industria textil, siendo frecuentemente usado como materia prima en la producción de materiales poliméricos. Es un derivado de antraceno y representa una clase importante de contaminante tóxico y recalcitrante.

Cuando se cultivan los hongos en medios sólidos con colorantes como el antraquinónico RBBR y la polimérica Poly-R- 478 (figura 1.6), simultáneamente al crecimiento normal del hongo, se va produciendo un halo de decoloración debajo del hongo que permite visualizar la actividad ligninolítica. Dicha decoloración es producida por la ruptura por parte de las enzimas de los enlaces que les otorgan color, (e.g., enlaces azo), dando origen a productos incoloros. Los mecanismos de reacción no han sido aún definidos, sin embargo se sabe que la base de la remoción de color de los colorantes, se debe a una transformación por mecanismos complejos, más que una adsorción del mismo por el micelio (Palmieri *et al.*, 2005; Eichlerová *et al.*, 2005).



Existen numerosos antecedentes bibliográficos del estudio de la actividad enzimática a través de la degradación de colorantes poliméricos y la determinación de las CIMD. Estos ensayos han permitido identificar la peroxidasa extracelular producida por *Pleurotus ostreatus* (Vyas & Molitoris, 1995). Se estudió el rol de las isoenzimas de lacasas secretadas por este hongo en la decoloración de RBBR (Palmieri *et al.*, 2005). Otros ejemplos son el estudio en *Pleurotus calyptratus* donde la decoloración de RBBR era causada por las lacasas y MnPs (Eichlerová *et al.*, 2005). La producción de dichas enzimas estaba fuertemente influenciada por el tipo de medio de cultivo y por el colorante presente (Eichlerová *et al.*, 2006). También se ha estudiado el efecto de los metales sobre la actividad ligninolítica en diferentes especies de basidiomycetes con la ayuda de esta metodología. En particular se estudió la influencia del cadmio en la degradación del colorante Poly R-478; la decoloración total se logra varios días de cultivo después que en el caso del control (Baldrian *et al.*, 1996). La presencia de zinc, cobre y cadmio a igual concentración, influye de modo diferente la actividad ligninolítica vista a través de la degradación de Poly R-478, según la especie de basidiomycete considerada (Pointing *et al.*, 2000).

En consecuencia, la degradación de colorantes poliméricos (sustratos cromogénicos), es una herramienta útil, reproducible, barata y rápida que ha permitido detectar la actividad enzimática de estos hongos, así como hacer *screening* de cepas a emplear en procesos de biorremediación (Hernandez *et al.*, 2008).

Los ensayos con los colorantes poliméricos muestran el efecto de los metales sobre la actividad ligninolítica en conjunto (MnP, LiP, Lac). Para poder discriminar el efecto sobre cada enzima ligninolítica individual, se mide espectrofotométricamente la actividad enzimática a partir de complejos coloreados de las enzimas formados con moléculas características del ciclo catalítico de cada una de ellas. Los ensayos son específicos para cada una de las enzimas, MnP, LiP y Lac (ver Materiales y Métodos). En todos los casos las actividades se determinan en la enzima preformada a la cual se agrega metal y en el sobrenadante del medio cuando el hongo se crece en presencia del metal.

Se analiza la expresión génica a través de la medida de la acumulación de sus ARN mensajeros. Se elijen las peroxidasa manganeso-dependientes para este estudio, por ser enzimas representativas de la actividad ligninolítica que presentan las más fáciles condiciones de cultivo para la visualización, ya que trabajar con las LiP, exige condiciones de cultivo bajo atmósfera de N más estrictas. Para cada condición de cultivo (presencia de Zn, Mn y mezcla de Zn y Mn) se extrae el ARN total que debe ser de alta calidad, libre de ADN y debe conservar su perfil de expresión al procesarlo (Pfaffl, 2001; Bustin & Nolan, 2004). Por esto se trata con ADNasa previo a la síntesis del correspondiente ADN copia a través de una transcripción reversa. La cantidad de ARN de cada gen se cuantifica por PCR en tiempo real con oligonucleótidos específicos. Es el método más sensible para la detección y cuantificación del nivel de expresión génica con gran exactitud y fiabilidad. Es una técnica ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad, su buena reproducibilidad, su robustez y su amplio rango de cuantificación, aunado a que permite detectar pequeños cambios en la expresión del ARNm (anexo C). Se utilizó cuantificación relativa (método de Pfaffl) o sea que los valores de expresión son normalizados a un gen de expresión constitutiva para todas las condiciones en estudio y respecto a una condición de cultivo de referencia (se elije el cultivo control sin metal). La puesta a punto de la metodología se realizó en un estudio previo en nuestro laboratorio (Barraco, 2009).

Por último se realizó un ensayo de campo para evaluar la durabilidad adquirida por madera de pino tratada con la solución proveniente del proceso de reciclado, a través de un cementerio de estacas, basado en la norma EN252 modificada. Permite conocer otros posibles usos de la madera protegida con la solución proveniente del proceso de reciclado e involucra todos los aspectos estudiados previamente junto a los factores ambientales (físicos, biológicos, etc) que acompañan aquellos usos donde la madera tratada está en contacto con el suelo. Se tienen en cuenta resultados previos de laboratorio: se pudo observar una disminución del efecto fungicida e insecticida de la solución cuando se realizaba el ensayo de lixiviación (o deslavado) a las probetas antes de ser expuestas al agente biótico correspondiente. En consecuencia la solución en estudio podría usarse como conservador para madera, en ambientes no húmedos y fuera del contacto con el suelo. Para estos usos debía combinarse la solución con otro producto químico que ayudara a mantener o fijar los metales en la madera. Se realizó una selección inicial a nivel de laboratorio, aplicando soluciones de boratos o silicatos por inmersión o por pincelado, a las probetas ya impregnadas con la solución del proceso de reciclado por el método Bethell (Ibáñez *et al.*,

2008). Se combinan las ventajas de los agentes preservantes, como lo hacen varias patentes (Lihme, 1904; Lloyd, 2001; Marney, 2008). De los resultados obtenidos y considerando la facilidad de aplicación se emplearon los boratos como segundo producto a aplicar a las probetas en el ensayo de campo. Los boratos son tóxicos a hongos e insectos, pero tienen baja toxicidad a mamíferos, no son corrosivos, son inodoros e incoloros, pH neutro además de ser ignífugos (Manning, 2008). Es posible la formación del borato de zinc *in situ* sobre la superficie de la madera, luego del doble tratamiento. El borato de zinc, es el menos lixiviable de todos los boratos, pero debido a esa baja solubilidad es inadecuado para aplicar en madera sólida, incorporándose como polvo sólido en maderas compuestas (Laks, 1995; Furuno, 2003). Por lo tanto en el diseño del ensayo de campo se compara la efectividad de tres tipos de probetas: a) aquellas tratadas solo con la solución en estudio a presión, b) las probetas primero tratadas como a) y luego se aplica bórax por pincelado; c) aquellas primero tratadas como a) y luego se aplica bórax a presión.

2 - INFLUENCIA DEL ZINC Y EL MANGANESO EN LA FISIOLOGÍA FÚNGICA

2.1 - EFECTO DE LOS SULFATOS PUROS DE Zn Y Mn SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

El objetivo de esta etapa es examinar la respuesta fisiológica de los hongos de la podredumbre blanca de la madera, a la presencia de sulfatos puros de Zn, de Mn y de la mezcla de Zn y Mn en relación 2:1 en el medio, empleando *P. chrysosporium* y *P. atropurpurascens*. Se realizan dos abordajes, uno global a través del análisis del crecimiento fúngico y otro específico a través del análisis del sistema enzimático ligninolítico (LiP, MnP y Lac), centrado luego en las MnPs.

2.2 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1. Efecto de los metales sobre la germinación de conidios

Los basidiomycetes al igual que otros hongos se propagan comúnmente por esporas asexuales externas, conidios. Los conidios son de gran importancia en el ciclo de vida de los hongos, por ser un medio de multiplicación vegetativa, dispersión y supervivencia. Son fácilmente dispersados por corrientes de aire por su alta hidrofobicidad y en ciertos casos tienen tendencia a adherirse a una superficie donde puedan germinar y crecer.

Las condiciones ambientales, los compuestos químicos presentes en el medio influyen positiva o negativamente sobre la germinación. Se analizó la capacidad de las soluciones de Zn, Mn y mezcla de ambos metales de inhibir la germinación de los conidios de las especies en estudio. Se colocó una gota de suspensión de conidios sobre una fina capa de malta – agar, suplementado con distintas concentraciones de metales, cultivado a 28°C (figura 2.1). Se observa al microscopio de contraste de fases por 60 horas.

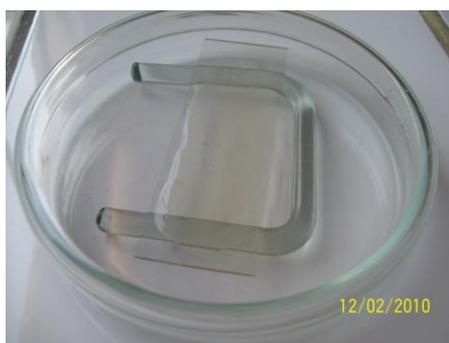


Figura 2.1: Fotografía del ensayo para determinar el efecto de metales sobre la germinación de conidios.

Sobre el portaobjetos hay una delgada capa de medio de cultivo adicionada con los metales, donde se coloca la suspensión de esporas de cada hongo, para incubarse.

La germinación comenzó a las 12 horas para *P. chrysosporium* y a las 17 horas para *P. atropurpurascens*; la observación se siguió por 48 horas más. El efecto inhibitor del Zn es mayor sobre los conidios de *P. atropurpurascens* que no germinan a concentraciones tan bajas como 0,16 mM en Zn; mientras que la germinación de *P. chrysosporium* es inhibida a 1 mM en Zn. Frente al Mn la germinación de los conidios también varía con la especie considerada, siendo inhibitor a 1,5 mM para *P.*

chrysosporium y solo 0,5 mM para *P. atropurpurascens*. La adición de Mn al Zn, tiene un ligero efecto inhibitor a bajas concentraciones, pero permite que haya un 10 % de conidios de *P. chrysosporium* germinados a 1,5 mM en Zn - 0,7 mM en Mn. Este aumento de la concentración mínima que inhibe la germinación respecto a la solución de Zn, es menor en *P. atropurpurascens*, que es inhibido a 0,25 mM en Zn – 0,12 mM en Mn. En la tabla 2.1 se encuentran los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de metal a las 19 horas de cultivo, tiempo al cual los conidios en los cultivos sin metales habían germinado y presentaban tubos germinativos largos en ambas especies.



Tabla 2.1: Descripción del estado de los conidios a distintas concentraciones de metal a las 19 horas de cultivo para los basidiomycetes en estudio.

En la figura 2.2 se observa el aspecto de los conidios a 0, 14 y 19 horas de cultivo del control sin metal y en presencia de metales a diferentes concentraciones para *P. chrysosporium*. Obsérvese que a las 19 horas el control presenta tubos germinativos largos (d). Para *P. atropurpurascens* una concentración tan baja como 0,16 Zn-0,12 Mn solo permite la germinación de un 25 % de los conidios. Frente a los metales la germinación de los conidios de *P. atropurpurascens* se mostró mucho más sensible.

El ensayo sobre un sustrato sólido simula en cierta medida la situación natural donde los conidios deben germinar sobre la madera, expuestos a los factores ambientales determinantes en la germinación. Estos resultados estarían indicando un efecto protector de las sales de metales frente al ataque inicial por conidios. En estas condiciones la sensibilidad de los conidios a la presencia de los metales en el medio varía con la especie, En *P. chrysosporium* las CIM (concentraciones mínimas metálicas que inhiben la germinación de conidios) son: 1 mM en Zn, 1,5 mM en Mn, y para la mezcla 2 mM en Zn y 1 mM en Mn. En *P. atropurpurascens* las CIM (concentraciones mínimas metálicas que

inhiben la germinación de conidios) son: 0,16 mM en Zn, 0,5 mM en Mn, y para la mezcla 0,25 mM en Zn y 0,12 mM en Mn.

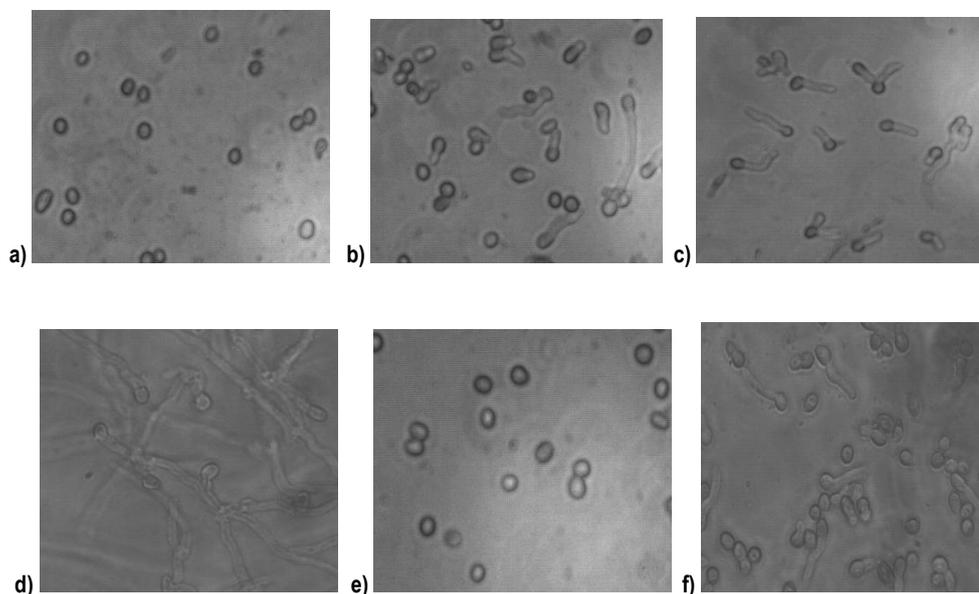


Figura 2.2: Conidios sobre agar- malta suplementado con soluciones de metales a distintas concentraciones a distintos tiempos de cultivo.

Conidios de *P. chrysosporium* : a) a tiempo 0, b) a las 14 hrs para 0,33 mM de Zn, c) a las 19 hrs para 0,25 mM en Mn, d) a las 19 hrs para sin metal.

Conidios de *P. atropurpurascens*: e) a tiempo cero, f) a las 19 hrs para 0,16 Zn-0,12 Mn.

2.2.2. Efecto de los metales sobre el crecimiento micelial

El crecimiento micelial es el parámetro fisiológico más estudiado desde el punto de vista de la toxicidad de los metales. Esto es debido a la capacidad de los hongos de la pudrición blanca de la madera de bioacumular, secuestrar, absorber metales desde soluciones diluidas, fenómenos que les permiten tolerar concentraciones relativamente elevadas de metales (Gadd, 1990; Baldrian, 2003). Como generalmente la concentración metálica en la madera, su sustrato natural es baja, al pensar en un producto funguicida se debe conocer el efecto de los metales a distintas concentraciones hasta alcanzar los niveles tóxicos. Para ello se determinaron las concentraciones de Zn, Mn y la mezcla de ambos metales en relación 2:1, sobre el crecimiento de los hongos en estudio, tanto sobre un medio de agar-malta, como sobre madera.

2.2.2.1 Crecimiento en agar - malta

El cultivo de los hongos en medio ágar-malta adicionado con soluciones de ZnSO₄, MnSO₄ y mezcla de ZnSO₄ y MnSO₄ (2:1), a distintas concentraciones de cada solución, permite estudiar la inhibición o estimulación del crecimiento de los hongos por efecto de los metales. Se determina la medida del área de las colonias miceliales en mm² y se calcula de la velocidad inicial de crecimiento. La toxicidad de las soluciones se cuantifica a través de la determinación de la CIM, que es función de las condiciones de la prueba (Borokhov *et al.*, 2000; Hatvani *et al.*, 2003).

Para determinar el rango de concentraciones de las soluciones a ensayar, se tomó como referencia el comportamiento del CuSO₄, producto de efectividad comprobada como funguicida. El sulfato comercial que se aplica a la madera posee un 5% en Cu (794 mM en Cu) pero la concentración máxima en Zn de la solución obtenida en el proceso de reciclado es de 3% en Zn (458 mM en Zn). Como los pesos moleculares del Cu (63,5) y del Zn (65,4) son similares, para evaluar el comportamiento del CuSO₄ en los ensayos en placa se proyectaron 3 diluciones de una solución al 3% (1/10, 1/100 y 1/1000). Estas concentraciones se ensayaron con los hongos en las mismas condiciones que se ensayarían las soluciones de Zn y Mn. El crecimiento micelial es inhibido a 5 mM en Cu (anexo A.2), resultado compatible con los datos bibliográficos (Pointing *et al.*, 2000; Singahl *et al.*, 2001). Por lo tanto se utiliza el rango de concentraciones empleado para el Cu, en los ensayos con Zn, Mn y Zn -Mn.

En agar - malta sin solución metálica agregada (controles), las especies estudiadas crecieron a diferentes velocidades; *P. atropurpurascens* crece a menor velocidad que *P. chrysosporium*. La respuesta obtenida ante la presencia en el medio de cultivo de la solución de ZnSO₄ depende de la especie de hongo considerada y de la concentración del metal. La figura 2.3 muestra las curvas de crecimiento para ambos basidiomycetes. Una concentración de 0,5 mM de ZnSO₄, inhibe el crecimiento casi en un 50% de *P. atropurpurascens* respecto al control (0 mM en Zn), mientras que el crecimiento de *P. chrysosporium* parece no ser influenciado significativamente ($P < 0,05$) a esta concentración de ZnSO₄. Sólo *P. chrysosporium* crece a 1 mM en Zn; sin embargo el crecimiento de ambos es completamente inhibido a partir de una concentración de ZnSO₄ de 2 mM, hasta los 21 días del ensayo.

De acuerdo a estos resultados los valores de CIM para la solución de ZnSO₄ son especie dependiente, siendo 2 mM frente a *P. chrysosporium* y 1 mM frente a *P. atropurpurascens*. Este último hongo parece ser más sensible a la presencia del Zn en el medio que *P. chrysosporium*.

Las concentraciones de Zn halladas que producen inhibición del crecimiento en medio sólido, están dentro del rango de las encontradas en bibliografía. Por ejemplo una concentración de 0,2 mM en Zn inhibió el crecimiento de *P. chrysosporium* en medio líquido (Hatvani *et al.*, 2003), en tanto que se ha observado efecto inhibitorio a 6 mM en Zn (Takehiro *et al.*, 1999). En las mismas condiciones de cultivo que este trabajo, una concentración de ZnSO₄ de 1,0 mM produce una inhibición total del crecimiento de *P. chrysosporium* (Pointing *et al.*, 2000) valor menor a la CIM obtenida. La mayoría de las concentraciones en Zn citadas son muy bajas, hecho que sorprende debido a la importancia biológica del

Zn ya que es uno de los metales menos tóxicos en general, siendo su nivel intracelular de 0,1 mM (Pointing *et al.*, 2000).

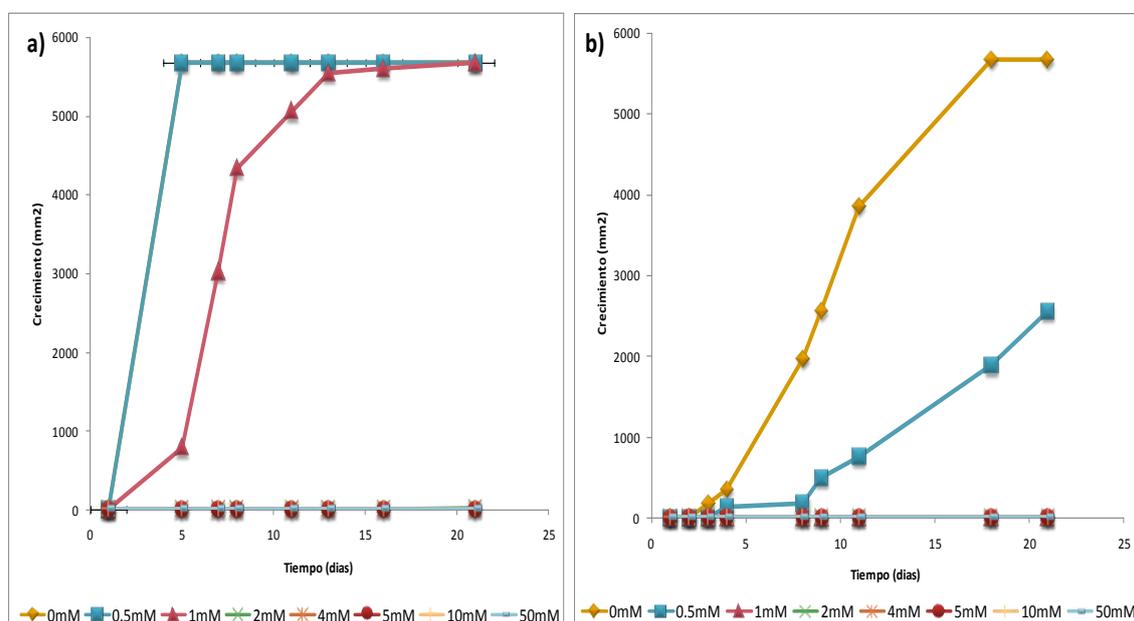


Figura 2.3: Curvas de crecimiento en presencia de ZnSO₄ en el medio de cultivo: a) *P. chrysosporium*. Obsérvese que las curvas correspondientes a 0mM y 0.5mM en Zn se superponen; **b) *P. atropurpurascens*.** Es inhibido a partir de una concentración de 1mM en Zn.

Cuando se analiza el efecto de adicionar MnSO₄ al medio de cultivo en el mismo rango de concentraciones empleado con el ZnSO₄, se observa que el Mn no inhibe el crecimiento, por el contrario en ciertas concentraciones lo estimula alcanzando velocidades de crecimiento mayores que en el control sin metal (0mM en Mn). Para *P. chrysosporium* el efecto del Mn es antagónico al ya visto para Zn, ya que crece a todas las concentraciones ensayadas, incluso a 100 mM en Mn; en cambio *P. atropurpurascens* crece solamente hasta una concentración de 10 mM en Mn, luego de la cual (a 20 mM) hay inhibición completa del crecimiento (figura 2.4). Nuevamente *P. atropurpurascens* presenta un comportamiento diferente, mayor sensibilidad a la presencia de los metales, ya que su crecimiento se ve menos estimulado por la presencia de Mn en el medio.

La capacidad del Mn de estimular el crecimiento fúngico ha sido informada para *P. chrysosporium*; se sabe que una concentración de 6 mM en Mn aumenta ligeramente la velocidad de crecimiento (Baldrian, 2003), mientras que concentraciones menores no lo afectan (Takehiro *et al.*, 1999) y a partir de 6 mM disminuye la velocidad de crecimiento. Si bien estos valores dependen de las condiciones de cultivo en general, *P. chrysosporium*, puede sobrevivir y crecer en medios con altas concentraciones de metales, lo que evidencia su resistencia y su capacidad de bioacumular metales;

crece a concentraciones mayores a 2,6 mM de metales como Cd, Cu, Pb y Ni y su crecimiento es estimulado a una concentración de 0,6 mM de metal (Falih, 1997).

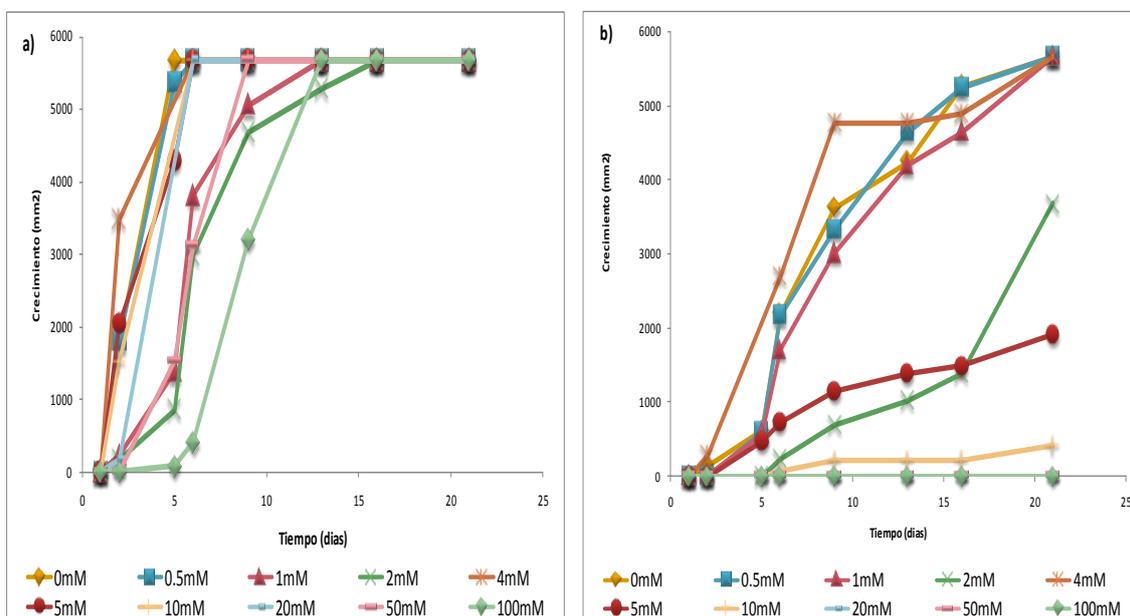


Figura 2.4: Curvas de crecimiento en función del tiempo en presencia de MnSO₄, en el medio de cultivo: a) *P. chrysosporium*. A todas las concentraciones de Mn ensayadas hay crecimiento; b) *P. atropurpurascens*.

La presencia de Mn en el medio de cultivo donde crece *P. chrysosporium* produce un cambio de color en la placa a partir de una concentración de 4 mM en Mn (figura 2.5). Los cambios en la morfología micelial (densidad y color) debido a la toxicidad de ciertos metales es frecuente en la mayoría de los hongos y ocurre en todos los grupos (Baldrian, 2003; Guillén & Machuca, 2008). Observadas al microscopio las hifas permanecen hialinas. Por lo tanto el cambio de color en el medio de cultivo no se debe a la producción de melaninas, que comúnmente son generadas como mecanismos de resistencia a la toxicidad metálica, sino a la producción de un compuesto extracelular que oscurece el medio de cultivo.

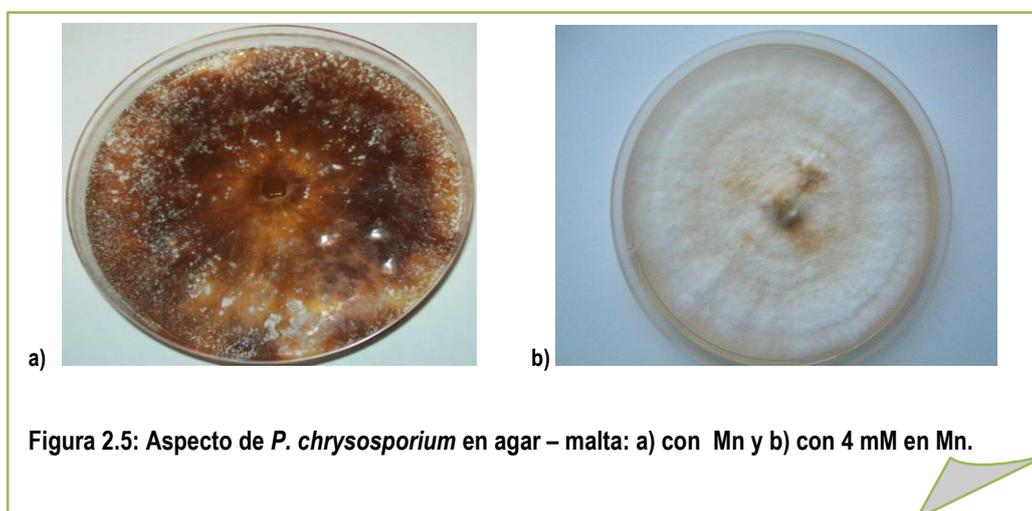


Figura 2.5: Aspecto de *P. chrysosporium* en agar – malta: a) con Mn y b) con 4 mM en Mn.

Al determinar el efecto de los dos metales juntos en el medio de cultivo, se analiza si ese efecto es antagónico o sinérgico. Cuando la concentración de la mezcla de sulfatos al medio es de 0,5 mM en $ZnSO_4$ (0,25 mM en $MnSO_4$), ambos hongos ven afectado su crecimiento observándose una disminución en la velocidad respecto al control sin metales. A concentraciones mayores de metales el comportamiento de los hongos es ligeramente diferente. *P. chrysosporium* crece en un medio adicionado con 4 mM de $ZnSO_4$ (2 mM de $MnSO_4$) mientras que *P. atropurpurascens* presenta su crecimiento totalmente inhibido a esa concentración. La figura 2.6 muestra las curvas de crecimiento para ambos hongos.

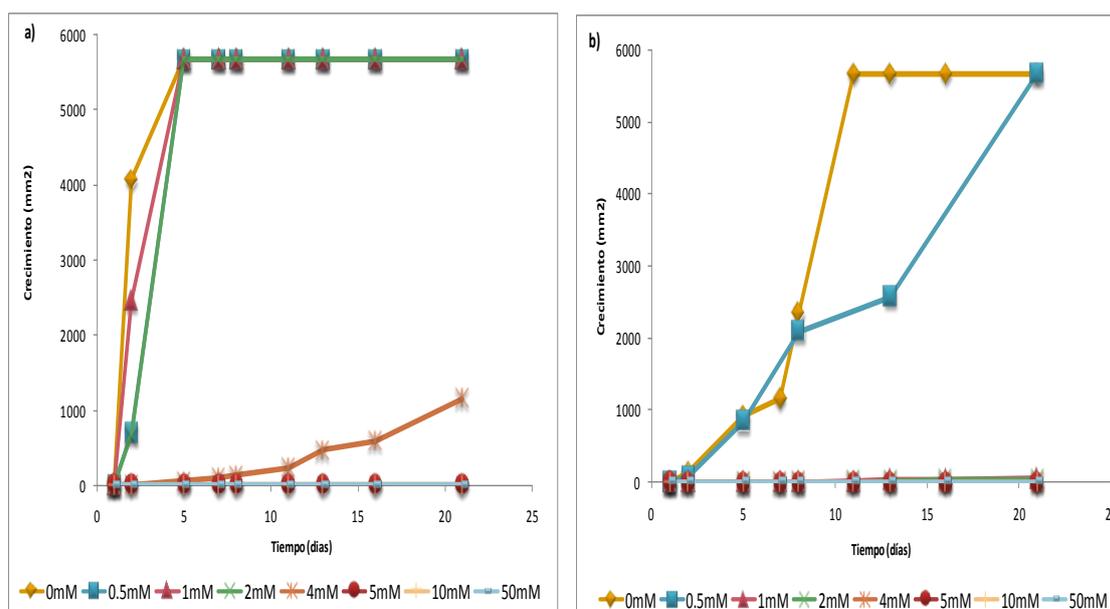


Figura 2.6: Curvas de crecimiento en presencia de $ZnSO_4$ - $MnSO_4$: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*. Las concentraciones se refieren al $ZnSO_4$; en la mezcla la relación de los metales Zn:Mn es 2:1.

Por la escala empleada en la gráfica no se puede observar que en *P. atropurpurascens* hay crecimiento micelial a partir del día 11 de cultivo a las concentraciones de 1 y 2 mM en Zn de la mezcla de soluciones, que alcanza solamente un 18% del total de la placa (50 mm² para 1 mM y 40 mm² para 2 mM en Zn) al día 21 de cultivo.

Nuevamente se observa una mayor sensibilidad de *P. atropurpurascens* a la presencia de la mezcla de metales en el medio de cultivo. No se encontraron antecedentes bibliográficos del efecto de la mezcla de metales ensayados. Con la mezcla de $ZnSO_4$ y $MnSO_4$ en el medio, la CIM es de 5 mM en $ZnSO_4$ (2,5 mM de $MnSO_4$) para *P. chrysosporium*, en tanto que frente a *P. atropurpurascens* la CIM de la mezcla es 4 mM en $ZnSO_4$ (2 mM de $MnSO_4$).

El efecto de cada metal sobre el crecimiento de los basidiomycetes ensayados, varía tanto con el metal y su concentración como con el basidiomycete considerado. Esto se resume en la figura 2.7, donde se compara las velocidades iniciales de crecimiento (determinadas hasta el día 9 de cultivo), en función de la concentración de cada metal en la solución. Las diferencias en la velocidad inicial de crecimiento en los ensayos a concentración metálica 0 mM, no son significativas a un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$ (p-

value > 0,8), para ambos hongos. Se destaca el efecto del Mn, ya que ciertas concentraciones del mismo estimulan el crecimiento fúngico por encima del control sin metal: a 4 mM en Mn *P. atropurpurascens* incrementa su velocidad inicial de crecimiento en un 13% respecto a la velocidad inicial del blanco sin metal; un incremento análogo del 19 % se observa en *P. chrysosporium* a una concentración de Mn de 20 y 50 mM. Por otra parte, el efecto del agregado de Mn en relación 2:1 al Zn, es antagónico al del Zn frente a *P. chrysosporium*, ya que induce el crecimiento a concentraciones de 2 y 4 mM donde el Zn solo en el medio impedía el crecimiento. Sin embargo el agregado de Mn no produce cambios al valor de CIM para *P. atropurpurascens* que continúa siendo 1 mM en Zn. Frente a los dos metales y su mezcla, *P. atropurpurascens* presenta una mayor sensibilidad (menores velocidades de crecimiento en iguales condiciones de cultivo). Es común encontrar variedad de respuestas frente al Zn, al Mn y a los metales en general entre las diferentes especies de hongos descomponedores de madera (variabilidad intraespecífica e interespecífica); otras especies como *Lentinus edodes*, ven inhibido su crecimiento en un 50% respecto al control sin metal por la presencia de concentraciones tan bajas como 0,46 mM de Zn ó 3,1 mM de Mn (Hatvani *et al.*, 2003).

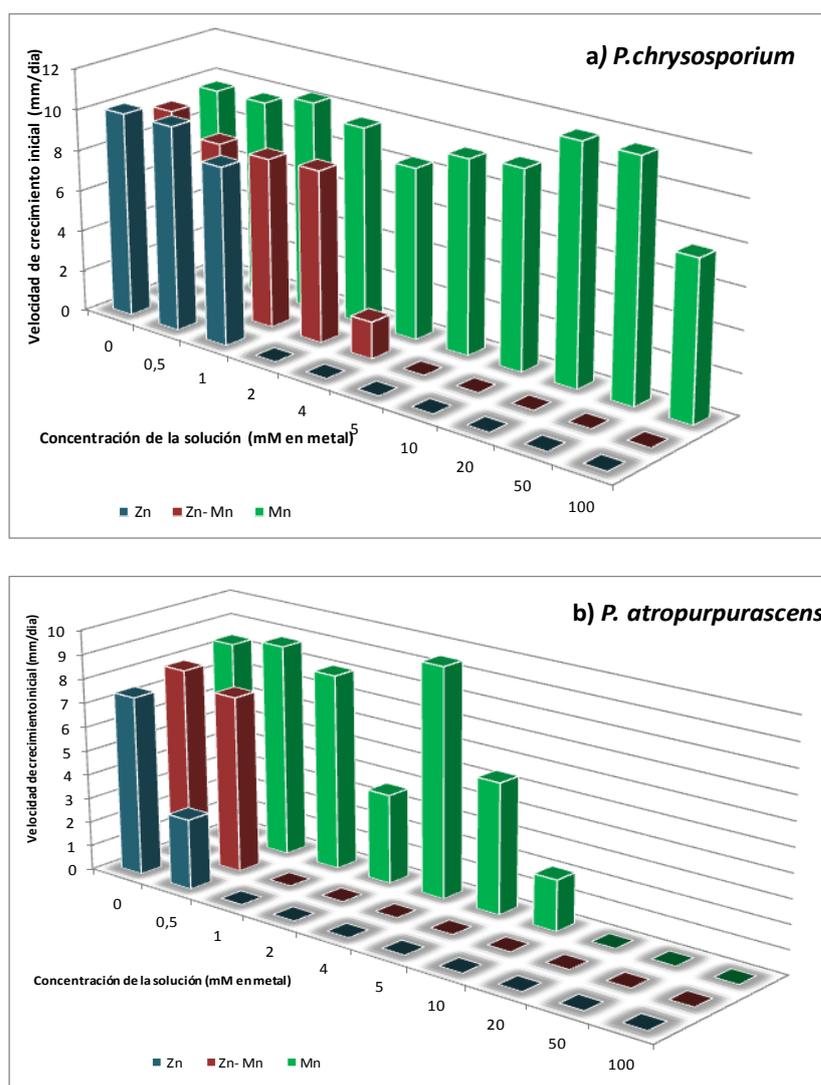


Figura 2.7: Velocidades iniciales de crecimiento en función de la concentración de metal en la solución (mM).

a) *P. chrysosporium*
b) *P. atropurpurascens*.

2.2.2.2 Crecimiento sobre madera.

Conocidas las CIM de los sulfatos de Zn y Mn frente a los hongos en estudio, determinadas en ensayos rápidos de *screening* en placas de agar – malta, se determinan las CIM cuando los hongos crecen sobre su sustrato natural, madera. Este tipo de ensayos permite visualizar el efecto de los metales sobre el crecimiento fúngico considerando además las posibles interacciones entre la estructura de la madera y el ingrediente activo del potencial preservante, en este caso los metales, vinculado a la permanencia de los metales en la madera tratada, al realizar ensayos de deslavado del principio activo sobre las probetas, previo a la exposición a los hongos.

Se realizaron ensayos con minibloques de *Pinus taeda*. Estos ensayos son más simples, rápidos y económicos que aquellos basados en la norma EN 113:1996. Las pequeñas probetas impregnadas y las blanco sin tratar son expuestas a los hongos en estudio, junto a dos hongos recomendados por la norma. El efecto sobre el crecimiento fúngico, o sea la eficacia de la solución preservante se determina a través de las pérdidas de peso corregidas de las probetas impregnadas luego de 4 semanas de exposición a los hongos (ver Materiales y Métodos). Los valores de aceptación o rechazo de los porcentajes de pérdidas de peso del tratamiento realizado a la madera, se toman de la norma (Bravery, 1978; Brown *et al.*, 1991). En la figura 2.8 se muestran placas armadas para el ensayo, luego que las probetas de madera son expuestas a los hongos.

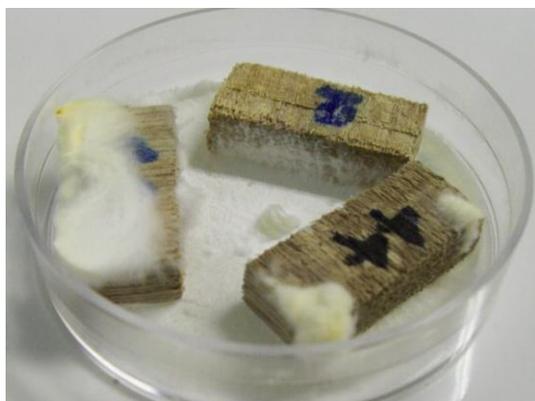


Figura 2.8: *C. versicolor* en agar – malta y probetas de pino.

Dos probetas están tratadas con mezcla de sulfatos de Zn y Mn y una control sin tratar.

Al impregnar las probetas de pino con la mezcla de sulfatos de Zn y Mn en relación 2:1 a dos concentraciones (1,5 % y 3 % en Zn), se trabaja con una composición similar a la de la solución obtenida en el proceso de reciclado de pilas. La concentración de solución de 3 % en Zn (1,5 % en Mn) equivale a la máxima concentración en Zn obtenida en el proceso de reciclado (siguiente sección). La tabla 2.2 muestra los resultados obtenidos luego de exponer las probetas tratadas a los basidiomycetes durante cuatro semanas. En la misma se muestran los promedios de las pérdidas de masa (%) para cada hongo a cada concentración ensayada junto a su correspondiente desviación estándar y la retención promedio de solución ensayada en cada nivel de concentración.

	Blanco		1,5% Zn -Mn		Retención(kg/m3)	3%Zn -Mn		Retención(kg/m3)
	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.		Perdida masa(%)	Des.est.	
<i>G. trabeum</i>	37,7	8,5	36,1	2,9	14,2	2,1	0,1	29
<i>P. chrysosporium</i>	43,5	3,1	33,7	2,8	14,2	1,9	0,8	29
<i>P. atropurpurascens</i>	66,3	3,6	3,9	0,9	14,2	1,8	0,4	29
<i>T. versicolor</i>	33,1	1,7	54,7	4,9	14,2	2,3	0,3	29

Tabla 2.2: Pérdidas de masa (%) de las probetas impregnadas con dos concentraciones de la mezcla de sulfatos de Zn y Mn.

Los promedios de las pérdidas de masa de las probetas control no tratadas, son todas mayores a 20 %, alcanzando el 66 % en el caso de *P. atropurpurascens*. Por lo tanto estos valores elevados, validan el ensayo (Bravery, 1978; Brown *et al.*, 1991). A una retención de 14,2 kg/m³ de solución, se puede observar que la madera se encuentra desprotegida, ya que para dos hongos el promedio de pérdidas de masa de las probetas es análogo al de los controles sin tratar. En el caso de *T. versicolor* la pérdida de masa es mayor al control lo que demuestra que la solución impregnante a esa concentración estimula el crecimiento de este basidiomycete. Solamente en presencia de *P. atropurpurascens* el promedio de pérdidas de masa es algo mayor a 3 %, valor límite para considerar protegida la madera (EN113).

A una retención de 29 kg/m³ de solución, el promedio de pérdidas de masa de las probetas es inferior a 3%, en consecuencia esta retención de solución impregnante (concentración) es la mínima que inhibe el crecimiento fúngico, protegiendo la madera: CIM de la mezcla de sulfatos puros de Zn:Mn (2:1), es 3 % en Zn (458 mM en Zn). Considerando que los ensayos sobre malta fueron proyectados haciendo diluciones al décimo de la concentración de 3% en Zn (50, 5 y 0,5 mM en Zn), no se observa correlación alguna entre ambos tipos de ensayo, lo cual era de esperar por las diferentes variables intrínsecas a cada ensayo.

2.2.3. Efectos de los metales sobre el sistema enzimático ligninolítico

2.2.3.1 Degradación de colorantes poliméricos

Al observarse un efecto inhibitorio de los metales sobre la velocidad de crecimiento micelial y por lo tanto de la biomasa formada en determinado tiempo de cultivo, es de esperar que estos influyan sobre la actividad enzimática extracelular.

El potencial ligninolítico de los hongos de la podredumbre blanca de la madera los ha convertido en protagonistas de distintos procesos de biorremediación por su capacidad de degradar sustancias recalcitrantes como tintas sintéticas entre otras. En el laboratorio esta habilidad se analiza a través de la degradación de colorantes poliméricos adicionados al medio, lo que origina un halo de diferente color

alrededor y debajo del área de crecimiento micelial (Borokhov *et al.*, 2000). La degradación del colorante debido a la actividad enzimática, depende de su complejidad estructural (identidad, número y posición de los grupos funcionales en la región aromática), su carga (distribución de electrones y densidad de carga) o puede resultar de todas las interacciones en su estructura, asociándose al potencial iónico. La determinación del área de los halos de decoloración en mm², en placas con colorantes se utiliza para evaluar el efecto de los metales sobre el sistema ligninolítico en conjunto de los hongos, figura 2.9 a y b.

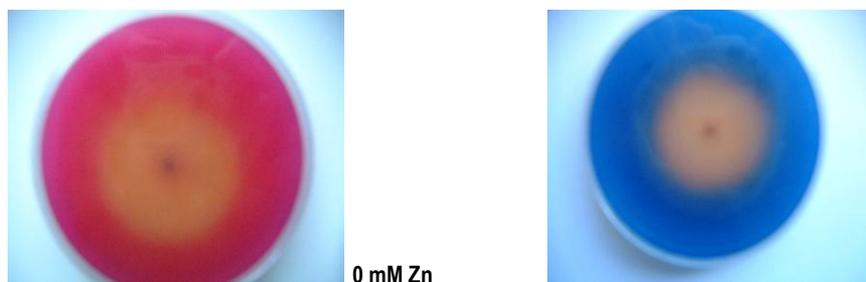


Figura 2.9: a) *P. chrysosporium* en medio conteniendo Poly-R 478 y RBBR, en el día 5 de incubación.

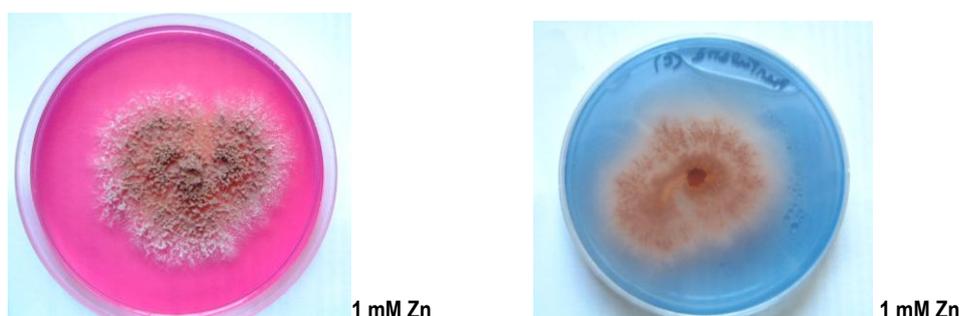


Figura 2.9: b) *P. atropurpurascens* en medio conteniendo RBBR y Poly-R 478 en el día 9 de incubación.

Previo al estudio del efecto de los metales, se debe observar si la presencia de los colorantes tuvo efectos sobre el crecimiento de los hongos constituyendo una variable adicional en el ensayo. Para ello se analiza la velocidad inicial de crecimiento de cada hongo en presencia y ausencia de los colorantes (figura 2.10).

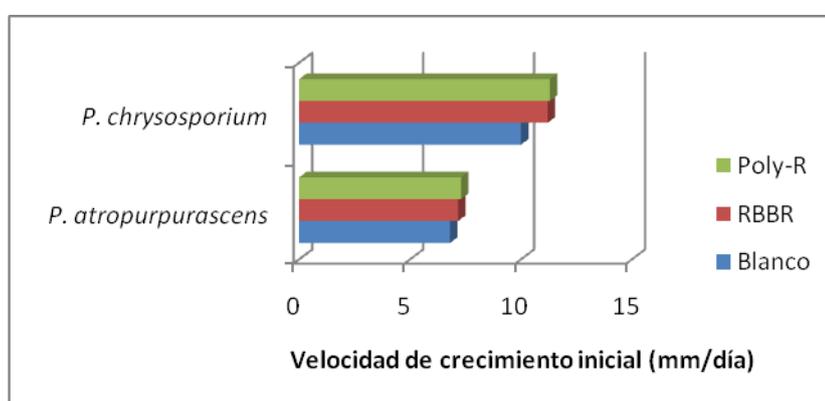


Figura 2.10: Velocidad de crecimiento inicial en presencia de los colorantes (Poly-R 478 y RBBR): para *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium*.

La presencia de los colorantes poliméricos no afecta la velocidad de crecimiento inicial (hasta el día 9^{no} de cultivo), ya que las variaciones respecto a los blancos (sin colorante) no son significativas a un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$ ($p\text{-value} > 0,8$).

El análisis de las curvas de crecimiento de los hongos, determinadas a partir de la medida del diámetro del micelio en la placa, en presencia de RBBR muestra que siguen la misma tendencia que las curvas de crecimiento de los blancos sin colorante polimérico durante los 21 días de cultivo. En presencia de Poly-R 478, también se mantiene la tendencia pero hay una ligera disminución de las colonias a un mismo tiempo de cultivo, de un 10 a 20% respecto a los blancos. En el anexo A se encuentran las gráficas de área de crecimiento (mm^2) y halo de decoloración (mm^2) en función del tiempo de cultivo (días) para ambos hongos. Se puede observar que el efecto de los metales sobre la actividad enzimática, depende del metal considerado y de la especie de basidiomycete sobre la que actúan, del mismo modo que ocurría frente al crecimiento micelial.

En la placa control sin la adición de metal (0mM en Zn) de *P. chrysosporium*, se alcanzó el 100 % de decoloración el día 5^{to} de cultivo. Cuando se adicionó ZnSO_4 al medio de cultivo no se produjo degradación de ninguno de los colorantes (RBBR y Poly-R 478) o sea que se inhibió totalmente su actividad enzimática a todas las concentraciones de solución ensayadas (de 0,5 mM a 100 mM de Zn), a pesar de que a 0,5 mM hubo crecimiento similar al blanco y a 1mM se apreció crecimiento menor. La gran sensibilidad de la actividad enzimática de *P. chrysosporium* a la presencia de Zn en el medio encontrada, coincide con antecedentes bibliográficos que indican que la decoloración de Poly-R 478 es inhibida a concentraciones tan bajas como 0,1 mM en Zn (Pointing *et al.*, 2000; Baldrian, 2003).

La velocidad de decoloración del control sin metal (0 mM en Zn) de *P. atropurpurascens* es menor a la de *P. chrysosporium* ya que la decoloración de RBBR y Poly-R 478, comienza el día 5 de cultivo. Por esta razón los resultados no se expresan como velocidad inicial de decoloración (hasta el día 9 de cultivo) como en el caso de crecimiento micelial, sino como porcentaje de decoloración respecto a la placa totalmente decolorada. Luego del sexto día de cultivo se apreció actividad enzimática (decoloración), a 0,5 y 1 mM en Zn, alcanzando el 100% de decoloración el día 21 de cultivo a 0,5 mM en Zn. Una concentración de 4 mM en Mn inhibe la actividad enzimática, pero no el crecimiento micelial que es inhibido a 1 mM en Mn. En la tabla 2.3 se compara el porcentaje de decoloración en los días 13 y 16 de cultivo a las distintas concentraciones de Zn ensayada para *P. atropurpurascens* para ambos colorantes poliméricos.

Concentración solución (mM)	Decoloración (%)			
	RBBR		Poly-R	
	Día 13	Día 16	Día 13	Día 16
0	48,6	100	46,6	100
0,5	41,8	77,9	0,8	0,9
1	5,2	7,5	0,6	0,7
2	0,1	0,1	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
50	0	0	0	0

Tabla 2.3: Halo de decoloración para *P. atropurpurascens* con $ZnSO_4$. Ambos colorantes poliméricos en 13er y 16avo día de cultivo.

Tanto en este caso donde se adicionó $ZnSO_4$, como en las siguientes situaciones con $MnSO_4$ y ambos sulfatos mezclados, el resultado obtenido coincide con la literatura ya que el colorante antraquinónico RBBR es degradado más fácilmente y en mayor porcentaje que el Poly-R 478, a una misma concentración de metal el mismo día de cultivo (Hernandez-Luna *et al.*, 2008).

La adición de $MnSO_4$ al medio de cultivo de *P. chrysosporium*, no presenta efecto inhibitorio de la actividad enzimática a ninguna de las concentraciones ensayadas (desde 0,5 mM a 100 mM en Mn), lo mismo que ocurría con el crecimiento micelial. Se observaron porcentajes de decoloración de ambos colorantes cada vez menores desde 0mM en Mn hasta 4 mM en Mn, lo que indica una disminución en la actividad enzimática debida a la presencia de Mn. A una concentración de 5mM en Mn, hubo un cambio ya que la actividad enzimática fue inducida por la presencia de Mn, se alcanzó un 100% de decoloración al día sexto de cultivo. Luego disminuyó nuevamente la actividad enzimática con el aumento de concentración de Mn, a pesar de que se produjo decoloración incluso a 100 mM en Mn. La variación en la actividad enzimática con la concentración de Mn en el medio se aprecia claramente el día 5^{to} de cultivo en presencia de RBBR; en los días 13^{ro} y 16^{to}, hay 100 % de decoloración (tabla 2.4). En presencia de Poly-R 478, se dan las mismas variaciones de la actividad enzimática, pero a menor velocidad de decoloración. Para *P. atropurpurascens*, la máxima actividad enzimática se observa a una concentración de 0,5 mM en Mn, para ambos colorantes habiendo inhibición completa de la misma a 50 mM en Mn para RBBR y a 20 mM en Mn para Poly-R 478. Al igual que con Zn en el medio de cultivo, el crecimiento es inhibido antes que la actividad enzimática.

Concentración solución (mM)	Decoloración de RBBR (%)					
	<i>P. chrysosporium</i>			<i>P. atropurpurascens</i>		
	Día 5	Día 13	Día 16	Día 5	Día 13	Día 16
0	77,9	100	100	29,3	93	100
0,5	13	100	100	28	68,4	94,6
1	8	100	100	16,9	47	66,4
2	3	100	100	8,4	28,4	32,3
4	0	100	100	12,5	46,6	49,8
5	88,5	100	100	12,3	14,2	17,8
10	2	100	100	8	11,6	33,9
20	0	34,6	58,5	8	8	8
50	0	22,1	22,1	0	0	0
100	0	12,4	12,4	0	0	0

Tabla 2.4: Halo de decoloración *P. chrysosporium* y *P. atropurpurascens* con $MnSO_4$. RBBR en los días 5^{to}, 13^{ro} y 16^{vo} día de cultivo.

Cuando se analizó la actividad enzimática de los hongos en un medio adicionado con las mezclas de $ZnSO_4$ - $MnSO_4$ (2:1), se observó que *P. chrysosporium* solo decolora RBBR y Poly-R 478 a 0,5 mM en Zn:0,25 en Mn. *P. atropurpurascens* decolora el RBBR hasta una concentración de 10 mM en $ZnSO_4$ (5 mM en Mn) tabla 2.5.

El RBBR es decolorado por *P. atropurpurascens*, en presencia de 20 mM en Mn solo y a todas las concentraciones de la mezcla Zn –Mn, lo que implica la presencia de peroxidasas y oxidasas en el medio extracelular; sin embargo el Poly-R 478 no es degradado en las mismas condiciones iniciales y de cultivo. Esto puede deberse a que en la depolimerización del Poly- R 478 participen mediadores redox, que en las condiciones del ensayo no sean producidos, por lo tanto no ocurre la reacción esperada.

Concentración Solución (mM en Zn)	Decoloración de RBBR (%)		
	Día 8	Día 13	Día 16
0	31	93	100
0,5	30,6	40,4	58
1	6	19	46,5
2	10	20,7	43
4	6,5	12,5	37
5	1,7	3,5	4,5
10	0,8	2,3	4
50	0	0	0

Tabla 2.5: Halo de decoloración para *P. atropurpurascens* con $ZnSO_4$ - $MnSO_4$ (2:1). RBBR en los días 8^{vo}, 13^{ro} y 16^{vo} día de cultivo.

Las CIMD hallada depende del hongo considerado y del metal presente en el medio, así para *P. chrysosporium* la CIMD es 0,5 mM en Zn cuando en el medio hay ZnSO₄, en tanto que es 4 mM en Zn para *P. atropurpurascens*. En el caso que se adiciona MnSO₄ al medio, se estimula la actividad enzimática y los valores de CIMD se incrementan, para *P. atropurpurascens* es 50 mM en Mn y para *P. chrysosporium* es mayor a 100 mM en Mn (concentración más alta ensayada). Cuando ZnSO₄ y MnSO₄ (2:1) están presentes, la CIMD es 1 mM en Zn (0,5 mM en Mn) para *P. chrysosporium* y 50 mM para *P. atropurpurascens*, que coincide con el valor hallado para MnSO₄ en el medio. La tabla 2.6 resume estos valores.

CIMD	ZnSO ₄	MnSO ₄	ZnSO ₄ -MnSO ₄
	(mM en Zn)	(mM en Mn)	(mM en Zn)
<i>P. chrysosporium</i>	0,5	> 100	1
<i>P. atropurpurascens</i>	4	50	50
CIM			
<i>P. chrysosporium</i>	2	> 100	5
<i>P. atropurpurascens</i>	1	20	4

Tabla 2.6: Concentración Inhibitoria Mínima de Decoloración (CIMD) y Concentración Inhibitoria Mínima de Decoloración (CIM) hallados para *P. chrysosporium* y *P. atropurpurascens*.

Del análisis de las curvas de crecimiento y las curvas de la extensión radial de la decoloración se observa que la velocidad de crecimiento correlaciona con la decoloración en todas las muestras a pesar de que los valores de CIM y CIMD no siempre coinciden (tabla 2.7). En este análisis también se observa la mayor susceptibilidad del sistema degradativo de *P. chrysosporium* que presenta en general menores coeficientes de correlación que *P. atropurpurascens*. Solamente a 10 mM en Mn el coeficiente cae en ambos hongos, lo que implica que una concentración metálica alta varía en distinto grado la sensibilidad de la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento.

	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. atropurpurascens</i>
0 mM Me	0,927	0,956
0,5 mM Zn	crece, no decol	0,896
0,5mM Zn-0,25mM Mn	0,709	0,99
0,5 mM Mn	0,742	0,997
1 mM Zn	crece, no decol	crece, no decol
1mM Zn-0,5mM Mn	crece, no decol	0,741
1 mM Mn	0,97	0,866
2 mM Mn	0,973	0,994
4 mM Mn	0,912	0,929
5 mM Mn	0,972	0,948
10 mM Mn	0,597	0,565

Tabla 2.7: Coeficiente de correlación entre las curvas de crecimiento micelial y el tamaño del halo de decoloración.

2.2.3.2 Actividades de MnP, LiP y Lac determinadas espectrofotométricamente

La degradación de los colorantes poliméricos permite observar el efecto de los metales sobre la actividad ligninolítica en conjunto. Para conocer la influencia de los metales sobre cada enzima ligninolítica, se recurre a medidas espectrofotométricas de la actividad enzimática para cada uno de los hongos. Las determinaciones se realizan de acuerdo a las siguientes referencias: LiP según Tien & Kirk (1988), MnP según Castillo *et al.* (1994) y Lac según Galiano *et al.* (1991). Ver detalles en Materiales y Métodos.

Los basidiomycetes se cultivaron en distintas condiciones ya que para estos ensayos se utilizaron aquellas condiciones de no represión de la expresión relativa de los genes *mnp* (siguiente sección). Para *P. chrysosporium* se empleó CLB como medio y para *P. atropurpurascens* agua de malta al 1,25%, ambos cultivos estacionarios a 37°C y 28°C respectivamente.

En primera instancia se estudió la evolución de la actividad enzimática a lo largo del tiempo, para lo cual se cultivaron los hongos por 18 días tomándose 9 alícuotas del medio para determinar las actividades de las enzimas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.8.

		<i>P. chrysosporium</i>								
		CLB en cultivo estacionario a 37°C								
Día de cultivo		4	5	7	8	10	12	14	16	18
	MnP	10	4	88	48	92	162	85	177	112
	Lac	9	7	2	1	0	6	18	2	23
	LiP	1	0	7	0	0	0	0	0	0

		<i>P. atropurpurascens</i>								
		Malta (1,25%) en cultivo estacionario a 28°C								
Día de cultivo		4	5	7	8	10	12	14	16	18
	MnP	14	5	83	15	98	166	249	111	10
	Lac	19	0	10	23	7	7	11	6	2
	LiP	2	0	0	0	0	0	2	1	1

Tabla 2.8: Actividades enzimáticas (mU/ml) para *P. chrysosporium* y *P. atropurpurascens*, en función del tiempo de cultivo (días).

Las condiciones de cultivo para *P. chrysosporium* no solo permitieron visualizar una mayor expresión relativa de los genes *mnp*s, comparado con *P. atropurpurascens*, sino que además son capaces de incrementar su actividad enzimática. Lac *like* y LiP muestran valores bajos de actividad enzimática; Lac *like* tiene su valor máximo el día 23 de cultivo (datos no presentados). En el caso de *P. atropurpurascens* ocurre lo mismo, las condiciones de cultivo favorecen la actividad MnP frente a las otras enzimas.

El máximo valor de actividad de MnP se da el día 16 de cultivo para *P.chrysosporium* y el día 14 para *P.atropurpurascens*. Para el estudio del efecto de los metales sobre la actividad enzimática se realizan las determinaciones en el tiempo de cultivo correspondiente a la máxima expresión de los genes *mnp* (ver 3.2.1 y 3.2.2). Para *P.chrysosporium* es el 7^{mo} día de cultivo donde el valor de actividad enzimática es 88 mU. Para *P.atropurpurascens* el máximo de expresión es en el 8^{vo} día, como en ese día la actividad MnP es de solo 15 mU, se mide la actividad para ver efecto de metales el día 10^{mo} de cultivo donde la actividad es de 98 mU.

Como ya se indicó los metales pueden influir sobre las enzimas ligninolíticas a distintos niveles, cuando los basidiomycetes se cultivan en presencia de los metales, esta influencia puede ser intra o extracelular. Pero cuando los metales se agregan a las enzimas preformadas, el efecto es un “envenenamiento” de las mismas que inhibe la actividad. Se realizaron ambos estudios.

En la tabla 2.9 se presentan los valores de actividad enzimática para ambos basidiomycetes cultivados en presencia de los metales a distintas concentraciones. Obsérvese que *P.chrysosporium* en CLB a 37°C, es capaz de crecer a todas las concentraciones metálicas ensayadas (CIM 14 mM en Zn), a diferencia de lo ocurrido en medio sólido a 28°C, donde presentaba valores de CIM entre 2 mM en Zn y 5 mM en Zn en mezcla de sulfatos, a excepción del Mn (CIM > 100 mM). Esta mayor tolerancia a los metales en medio líquido se debe a fenómenos de adsorción de los metales en el micelio fúngico (Baldrian, 2003). Por el contrario *P.atropurpurascens* es más sensible a los metales y solo crece a bajas concentraciones de Zn y Zn-Mn, mientras que el Mn permite el crecimiento hasta 8mM.

Se puede observar un efecto inhibitorio del Zn sobre la actividad de las MnPs de ambos hongos; la actividad del cultivo control sin metal de *P. chrysosporium* es 88 mU; en presencia de Zn 2 mM, la concentración que permite la máxima actividad, apenas supera el 50 % del valor del control.

P. atropurpurascens es más sensible a la presencia de Zn y solo las menores concentraciones en el medio (0,25 y 0,5 mM en Zn) permiten el crecimiento micelial. Las siguientes concentraciones, 1 y 1,5 mM en Zn vistas al microscopio muestran que si bien no hay desarrollo de micelio, hay un 40 % germinación de conidios. Por esta razón se determinaron las actividades enzimáticas en esos medios de cultivo. Allí se detectaron bajos valores de actividad de las MnPs pero la actividad de Lac continúa a 2 mM en Zn con valores superiores a los hallados en el control sin metal (0 mU/ml), lo que indica que existe influencia de los metales sobre la actividad lacasa, lo que explicaría algunos de los resultados de decoloración. Es la primera vez que se observa influencia del Zn (no Cu) sobre la actividad de las lacasas.

El Mn, sustrato de las MnPs, tiene un claro efecto inductor de la actividad en ambos hongos; Lac y LiP mantienen bajos valores de actividad, pero tienen un pico que supera al control que difiere según el basidiomycete considerado. A partir de 0,5 mM en Mn (pico de actividad MnP: 740 mU), los cultivos de *P. chrysosporium* muestran un elevado incremento en su actividad MnP respecto al control a las restantes concentraciones en Mn ensayadas.

a) *P. chrysosporium*

Solución	Actividad enzimática (mU)							
ZnSO ₄ (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	3	4	42	28	47	8	3	2
LiP	20	5	5	2	7	1	17	6
Lac like	0	0	13	1	9	1	1	0

Solución	Actividad enzimática (mU)							
MnSO ₄ (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	59	740	596	698	416	395	163	146
LiP	0	20	6	2	5	42	0	5
Lac like	1	0	2	9	2	4	1	1

Solución	Actividad enzimática (mU)					
ZnSO ₄ -MnSO ₄ (mM)	0,5-0,25	1-0,5	2,0-1,0	4,0-2,0	8,0-4,0	12,0-6,0
MnP	127	132	127	7	9	1
LiP	0	4	0	2	1	0
Lac like	0	2	10	1	1	0

b) *P. atropurpurascens*

Solución	Actividad enzimática (mU)							
ZnSO ₄ (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	53	0	11	7	0	0	0	0
LiP	1	1	2	0	0	0	0	0
Lac	11	22	12	22	24	0	0	0

Solución	Actividad enzimática (mU)							
MnSO ₄ (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	257	183	22	19	13	47	0	0
LiP	0	1	1	0	0	0	1	1
Lac	13	49	3	9	4	9	11	0

Solución	Actividad enzimática (mU)					
ZnSO ₄ -MnSO ₄ (mM)	0,5-0,25	1-0,5	2,0-1,0	4,0-2,0	8,0-4,0	12,0-6,0
MnP	3	2	0	1	0	0
LiP	0	0	0	0	0	0
Lac	7	13	5	10	0	0

Tabla 2.9: Actividades enzimáticas (mU/ml) de las MnP, Lac y LiP. Cuando los basidiomycetes crecen en presencia de distintas concentraciones de metales Zn, Mn y mezcla Zn-Mn.

A diferencia de lo ocurrido con el Zn, el Mn en el medio de cultivo permite el crecimiento de *P.atropurpurascens* a concentraciones tan elevadas como 8 mM de Mn en el medio. De estos cultivos solo aquellos con 0,25 y 0,5 mM en Mn ven inducida la actividad MnP por el Mn hallándose el valor pico de actividad (257 mU) a 0,25 mM en Mn. Concentraciones mayores a 8mM en Mn inhiben la actividad de las MnPs.

Cuando están presentes ambos metales en el medio, el efecto hallado es diferente según el basidiomycete considerado. *P.atropurpurascens* ve inhibido su crecimiento micelial y la actividad enzimática a todas las concentraciones ensayadas, mientras que frente a *P. chrysosporium* se observa el

efecto antagonico de los metales ya que la actividad MnP es dos órdenes de magnitud superior a la hallada en los cultivos con Zn (a igual concentración de Zn), hasta 4 mM en Zn- 2 mM en Mn, a partir de donde las actividades son de igual orden.

Finalmente el estudio de la influencia de los metales sobre las enzimas preformadas muestra que se da una disminución en los valores de actividad de las MnPs. Este efecto es más notorio con la mezcla de Zn-Mn que no permite actividades enzimáticas a ninguna de las concentraciones ensayadas (tabla 2.10). La actividad MnP de *P.atropurpurascens* parece ser menos sensible al envenenamiento con metales. Esto podría explicar el efecto observado de mayores valores de CIMD que de CIM para *P. atropurpurascenes* que para *P chrysosporium*.

a) <i>P. chrysosporium</i>								
Solución	Actividad enzimática (mU)							
ZnSO4 (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	22	12	19	9	3	2	3	4
MnSO4 (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	12	49	35	29	26	6	6	0
Solución	Actividad enzimática (mU)							
ZnSO4-MnSO4 (mM)	0,5-0,25	1-0,5	2,0-1,0	4,0-2,0	8,0-4,0	12,0-6,0		
MnP	0	1	1	0	0	0		
b) <i>P. atropurpurascens</i>								
Solución	Actividad enzimática (mU)							
ZnSO4 (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	67,8	80,7	93,6	106,5	34	12	7	0
Solución	Actividad enzimática (mU)							
MnSO4 (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
MnP	123	56	100	156	147	154	172	148
Solución	Actividad enzimática (mU)							
ZnSO4-MnSO4 (mM)	0,5-0,25	1-0,5	2,0-1,0	4,0-2,0	8,0-4,0	12,0-6,0		
MnP	0	0	0	0	0	0		

Tabla 2.10: Actividades enzimáticas (mU) de las MnP preformadas a las que se agregan distintas concentraciones de metales.

Asimismo, todo parece indicar que el micelio de *P.chrysosporium* presenta una mayor capacidad de adsorción de metales, y por ello es capaz de crecer a mayores concentraciones de los metales aunque con baja o nula actividad enzimática. Su actividad MnP es más sensible a la presencia de Zn y Mn.

Resumen de los resultados

Los resultados muestran que el sulfato puro de Zn tiene efecto inhibitorio sobre los distintos niveles de los dos parámetros de la fisiología de los basidiomycetes ensayados: el crecimiento y la actividad de las enzimas ligninolíticas. El Zn puede impedir la germinación de los conidios a concentraciones tan bajas como 0,66 y 1 mM en Zn en ensayos en los que se favorece la germinación. Al analizar el efecto sobre el crecimiento micelial se encuentran valores de CIM bajos; en un medio nutriente sólido la mayor CIM es de 2 mM en Zn, pero en medio líquido prima la diferencia en la sensibilidad de los microorganismos a la presencia de los metales. Una concentración de 1 mM en Zn inhibe totalmente el crecimiento de *P.atropurpurascens*, en tanto que *P.chrysosporium* es inhibido a 14 mM en Zn, a distinta temperatura y composición del medio. Su efecto sobre el sistema enzimático ligninolítico también es inhibitorio, la mayor CIMD es de 4 mM en Zn y sobre las enzimas individuales, inhibe la actividad enzimática a bajas concentraciones como 4 mM en Zn. Respecto a la expresión de los genes *mnps*, el Zn inhibe la expresión génica, siendo más sensible *P. atropurpurascens*, ya que los genes de presentan picos donde se induce la expresión (1 y 8 mM en Zn), que no se correlacionan con las determinaciones de actividad enzimática a esa concentraciones de metal.

En cambio el sulfato puro de Mn tiene un claro efecto inductor de la fisiología fúngica en un amplio rango de concentraciones. Tanto es así que a la mayor concentración de Mn ensayada (100 mM en Mn), se produce crecimiento micelial en medio sólido nutriente de *P.chrysosporium* mientras que *P. atropurpurascens* soporta una CIM alta de 20 mM en Mn. El mismo fenómeno ocurre en medio nutriente líquido, *P. atropurpurascens* que es más sensible a la presencia de los metales, puede crecer hasta una concentración de 8 mM en Mn en tanto que lo hace hasta 12 mM en Mn (máxima concentración ensayada). También es inductor de la actividad ligninolítica tanto a nivel de actividad como de expresión génica; las CIMD son mayores a 100 mM en Mn en medio nutriente y sobre las enzimas individuales mantiene valores muy altos de actividad (146 mU/ ml frente a 88 del control sin metal) a la mayor concentración ensayada. Los genes *mnp* de alcanzan valores de expresión relativa de 140 o 102 a 1 y 4 mM en Mn respectivamente (expresión del control sin metal es 1) para *P.chrysosporium* y de 40 a 0,5 mM en Mn para *P. atropurpurascens*.

Como era de esperar el efecto inductor del Mn incrementa las CIM y CIMD de los basidiomycetes respecto a los valores obtenidos solo con Zn, lo que demuestra que en las condiciones ensayadas los metales tienen efecto antagónico o nulo entre sí. Las CIM del sulfato de Mn en medio sólido nutriente se duplican, sin embargo en medio nutriente líquido tienen el mismo comportamiento que cuando hay sulfato de Zn solo en el medio para *P. chrysosporium* cuyo crecimiento es inhibido a 14 mM en Zn; *P. atropurpurascens* no crece en presencia de ambos metales a ninguna de las concentraciones estudiadas. La CIMD de *P. atropurpurascens* se incrementa en un orden respecto al valor de la solución de Zn y lo mismo ocurre sobre las actividades enzimáticas individuales. Los genes *mnp* de *P. chrysosporium* a ciertas concentraciones se induce su expresión, que es totalmente inhibida a 12 mM en Zn- 6 mM en Mn.

El estudio de crecimiento sobre madera tratada con la mezcla de sulfatos puros, muestra que la misma es capaz de inducir el crecimiento micelial a un concentración de 1,5% en Zn (14,2 kg/m³ de retención), pero protege la madera a 3% en Zn (29 kg/m³ de retención). Estos valores de concentración mínima inhibitoria no se correlacionan con los obtenidos en medios nutrientes.

3 – REGULACIÓN DEL SISTEMA MnP POR ZINC Y MANGANESO

3.1 Expresión de los genes *mnps*

Los metales pueden afectar diferentes etapas de la génesis enzimática, desde la expresión de los genes hasta la ubicación y activación de las proteínas. Conocido el efecto de los metales sobre la actividad MnP, se estudia el efecto a nivel de la expresión de los genes codificantes. Se analizó entonces la variación de la acumulación de ARNm correspondiente mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Dado que las MnP son una familia de proteínas con alta homología a nivel de secuencia y que el objetivo es caracterizar la expresión para cada uno de sus genes, en el diseño de los oligonucleótidos se debió prestar especial atención a lograr especificidad y evitar amplificaciones cruzadas. Además de los genes en estudio, se amplifica un gen de expresión constitutiva que se usa para normalizar o corregir las diferencias del material analizado en cada reacción. Todos los oligonucleótidos correspondientes a *P. chrysosporium* fueron diseñados a partir de las secuencias de su genoma publicado. En el caso de *P. atropurpurascens*, no hay genes identificados y menos aún secuencia de su genoma, por lo que el trabajo comenzó con el clonado de todos los genes *mnp* y de referencia, los que fueron secuenciados, para luego diseñar los oligonucleótidos para los estudios de expresión.

Con el objetivo de utilizar en los estudios a nivel molecular aislamientos genéticamente puros de los basidiomycetes ensayados, se obtuvieron cultivos monospóricos de cada uno de los hongos, con los cuáles se realizaron todos los ensayos siguientes (Materiales y Métodos).

3.1.1 *Phanerochaete chrysosporium*

3.1.1.1 Análisis *in silico* de la secuencia genómica de *P. chrysosporium*: *mnps* y genes de referencia.

El análisis de la base de datos del genoma JGI (<http://genome.jgi-psf.org>), permitió identificar cinco secuencias homólogas (*mnp1* id 140708, [scaffold 15](#); *mnp2* id 3589, [scaffold 5](#); *mnp3* id 70878, [scaffold 1](#); *mnp4* id 66507, [scaffold 15](#); *mnp5* id 78685, [scaffold 7](#)). A diferencia de lo observado para otros hongos degradadores de lignina, los genes *mnps* de *P. chrysosporium* no están físicamente juntos (*cluster*) sino que se encuentran distribuidos en el genoma.

Las proteínas correspondientes fueron predichas mediante Fgenesh.v2 y las secuencias genómicas analizadas respecto a los codones ATG y TGA de inicio y finalización respectivamente y los pie de intrón (figura 2.10). Todos los genes muestran 7 intrones con tamaños de entre 50 y 70 pb, típico de hongos filamentosos. También se observa una alta homología entre los transcritos (tabla 2.11). Las proteínas presentan tamaños similares (378 a 382 residuos) y altos valores de identidad y similitud (73,63% de identidad, 20,1% de similitud, BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Multalin, <http://npsa-pbil.ibcp.fr>, figura 2.11). En particular, las isoenzimas MnP1 y MnP4 son idénticas y sus genes (94% de homología) son totalmente conservados a nivel de los intrones. Estas diferencias a nivel de

secuencias codificantes no permiten la amplificación específica de cada transcrito, por lo que se analiza la expresión conjunta de *mnp 1 – 4*. Las isoenzimas MnP2 y MnP5, si bien no son idénticas presentan niveles de similitud muy altos (90,31% de identidad, 7,49% de similitud) por lo que su expresión se analiza en conjunto *mnp 2-5*.

a)

```

-40  acctcctcctcctcctccgggtcaacgggttgatccagATGGCCTTCAAGTCCCTCATCGCCTTCGTGCGCCCTCGCGG
                                     M A F K S L I A F V A L A
41  CCGCTGTTCGTGCTGCCCGACGGCGGTGTGCCCGACGGCAGCCCGCTCAGCCAGCGGGCGTCTCCGCTTTCATCCCT
    A A V R A A P T A V C P D G T R V S H A A C C A F I P
121  gtaagcaggcgcgctcgcagtagttgggctccaagtctgacactggcatgtccctagCTCGCGCAGGATTCGAAGA
                                     L A Q D L Q
201  GACCATCTTCCAGAATGAGTGGGTGAAGACGgtcagtgctgtctactagcctgccaggcgccgagactcatctgtg
    T I F Q N E C G E D
281  tttcgtagCCACAGGTCATTTCGCTGACGTTCCACGACGCCATCGCCATCTCTCGCTCCAGGGCCCAAGCgtgag
    E A H E V I R L T F H D A I A I S R S Q G P K
361  tctcgtgacggcagctcgttcatcgtttctgtgtcctgacagcagctgtgtttcgagCGGCGGGGTGCCAGCGCTCG
                                     G G G A D G S
441  ATGCTCCTGTTCGGACGGTCGAGCCAACTTCTCGGCAACAACGGCATCGACGACTCGGTCAACAACCTGATACCGTT
    M L L F P T V E P N F S A N N G I D D S V N N L I P F
521  CAAGATCTGCAGCGTTTCGAGGACCGCGTGGCTTCACGCCCTTCGAGGTCGCTCTCTGCTGGCCTCGCAACTGCCCGgtaa
    M Q K H N T I S A A D L V Q F A G A V A L S N C P
601  gcagtccttcaatgcctcgggttgcgcgcgacagctcgtttctgaccagtgaccacgcctgtggggtagGGTGACCCCGG
                                     G A P R
681  CTCGAGTTCCTGGCGGGCCGCCGAACAAGACGATCGCTGCCGTCGACGGACTGATCCCGAGCCGACAGGACAGCGTGAC
    L E F L A G R P N K T I A A V D G L I P E P Q D S V T
761  CAAGATCTGCAGCGTTTCGAGGACCGCGTGGCTTCACGCCCTTCGAGGTCGCTCTCTGCTGGCCTCGCAACTGCCCG
    K I L Q R F E D A G G F T P F E V V S L L A S H S V
841  CGCGCGGACAAAGGTCGACAGACGATCGACGCTGGCCCTTTGACTCGgtcagtgactgcccgtgtgttgagttacg
    A R A D K V D Q T I D A A P F D S
921  ccagacacggctaacgggcaagtcctcctcctcctccgagACTCCGTTACGTTTCGACACGCGAGGTTCCTCGAGGTGCT
                                     T P F T F D T Q V F L E V L
1001 GCTCAAGGGCGTTCGGCTTCCCGGGTCCCGAACAACACGGCGAGGTGGCGTCGCCGCTCCCGCTCGCGCAGCGCAGCG
    L K G V G F P G S A N N T G E V A S P L P L G S G S
1081 ACACGGCGAGATGGCGTGCAGTCCGACTTTGGCTCGCGCAGACCCGCGCAGCGGTGCATCGGAGGGCTTCGTG
    D T G E M R L Q S D F A L A H D P R T A C I W Q G F V
1161 AACGAGCAGGGCTTCATGGCCGAGCTTCAGGGCGGATGAGCAAGCTCGCTGTGCTCGGGCACAAACCGCAACAGCCT
    N E Q A F M A A S F R A A M S K L A V L G H N R N S L
                                     Phmnp1_qF
1241 GATCGACTGCAGCAGCTCGTCCCGTGCAGGCGGACTGGCCAGCCCGCATGTTCCCGCGTTCGACTGGCCCGC
    I D C S D V V P V P K P A T G Q P A M F P A S T G P
1321 AGGACCTGGAGCTGCTGCGCCCTCGGAGCGCTTCCCGACTGACTACCCAGCgtacgtcctcctggtttgtgacagtt
    Q D L E L S C P S E R F P T L T T
                                     Phmnp1_qR
1401 gccctatcgtgatcagttcgtgcaactggagCGGGCGGTTCGACGTCGCTGATCGCGCACTGCCCGACGCGCAGCATGT
    Q G A S Q S L I A H C P D G S M
1481 CCTGCCCGGTTCAGTTCAACGGCCCTGCATAAggcctctatccacatgcggtatctcacatggtcaaggttcttaact
    S C P G V Q F N G P A *
1561 atgaaggctattcgtctggtttatagttctcctcctcctgtgtgtgtacacgttgcagcctctagattctttgacgcg
    
```

b)

```

-60  agtcttcaggacatogagttccctctcagctctcaaggacatccgactcgaatatcgcaATGGCCTTCGGTCTCTCCT
                                     M A F G S S L L
21  CGCCTTCGTGGCTCTCGCCGCATAACTCGCGCCCGCCGACTGCGGAGTCTGCAGTCTGTCCAGACGGTACCCGCTCA
    A F V A L A A I T R A A P T A E S A V C P D G T R V T
101  CCAACGCGCGTGTGCGCTTTCATTCGgtaaatcctgattatttctatgctcaaatcgcaatcctgattcctcccctg
    N A A C C A F I P
181  agCTCGCAGGATTTGCAAGAGACTCTGTTCCAGGGTACTGTGGCAAGATGgtattcacctctctagtggcgccgc
    L A Q D L Q E T L F Q G D C G E D
261  ccacatcctagctaacgtgtgtgcttgagCCCACGAAGTCATCCGCTGACCTTCCgtgagtaaattgatagataatcct
    A H E V I R L T F
291  caaggtgtactgacggaggccttagACGACGCTATTGCAATCTCCAGAGCCTAGGTCTCAGCgtgatttcaacttttg
    D A I A I S Q S L G P Q A
341  tgca cctctagaaccagtaaaactcaactatgtcataagagTGGCGGGTGTGACGGCTCCATGCTGCACTTCCGCACA
    G G G A D G S M L H F P T
421  ATCGAGCCAACTTCCGCCAACAGCGCATCGATGACTCCGTCACAACTTGCTTCCCTTCATGCAGAAACACGACACC
    I E P N F S I D D S V N N L L P F M Q K H D T
501  ATCAGTGGCGCGATCTTGTACAGTTTCGCGGTGCGGTGCGCTGAGCAACTGCCCAgtaagccgataaccagttagatt
    I S A A D L V Q F A G A V A L S N C P
581  ggctcgcacagcgtctgacatgcgatgagGGTCTCTCGCTCGAGTTCATGGCTGGACGTCGAACTACCATCCCCGC
    G A P R L E F M A G R P N T T I P A
661  AGTTGAGGGCCTATTCCTGAGCCTCAAGACAGCGTCACCAAAATCCTGCAGCGCTTCGAGGACGCGGCAACTTCTCGCCG
    V E G L I P E P Q D S V T K I L Q R F E D A G N F S P
                                     Phmnp2_qF
741  TTGAGGTCGCTCGCTCTGGCTTACACACCGTTGCTCGTGGCAGAGGTCGACGAGACCATCGATGCTGCGCCG
    F E V V S L L A S H T V A R A D K V D E T I D A A P
    
```

```

821 TTCGACTCGgtaagacttctttgccccttgcctcagtgctgcgctaacaacctcgcagACACCCTTCACCTTCGACA
    F D S T P F T F D
901 CCCAGGTGTTCCTCGAGGTCCTGCTCAAGGGCACAGGCTTCCCGGGCTCGAACACAACACCGGCGAGGTGATGTCGC
    T Q V F L E V L L K G T G F P G S N N N T G E V M
    ← Phmp2_qR
981 CGCTCCCCTCGGCAGCGGCAGCGACACGGGCGAGATGCGCCTGCAGTCCGACTTTGCGCTCGCGCGCAGGAGCGCA
    S P L P L G S G S D T G E M R L Q S D F A L A R D E R
1061 CGGCGTGTCTTGGCAGTCGTTCTGCAACGAGCAGGATTCATGGCGGCGAGCTTCAAGGCCGATGGCGAA GCTT
    T A C F W Q S F V N E Q E F M A A S F K A A M A K L
1141 GCGATCCTCGGCCACAGCCGACGAGCCTCATTGACTGCAGCGAGCTCGTCCCGTCCCGAAGCCGCGCTCAACAAG
    A I L G H S R S S L I D C S D V V P V P K P A V N K
1221 CCCGCGACGTTCCCGCGCAGAGGGCCCAAGGACCTCGACACGCTCAGTGAAGGCCCTCAAGTTCGCGAGCGTG
    P A T F P A T K G P K D L D T L T C K A L K F P T L
1031 ACCTCTGACCgtagatgacttattcgttcacgaataagaatgaacctgaccaagattctcLagCCGGTGCTACCG
    T S D P G A A T
1111 AGACCCCTATCCCCACTGCTCCAACGGCGCATGTCTGCCCTGGTGTTCAGTTTCGATGGCCCTGCCTAAaccact
    E T L I P H C S N G G M S C P G V Q F D G P A *
1191 cacctccggaatgacacttttagtagatgctgattctatttggtgattagaag
    
```

c)

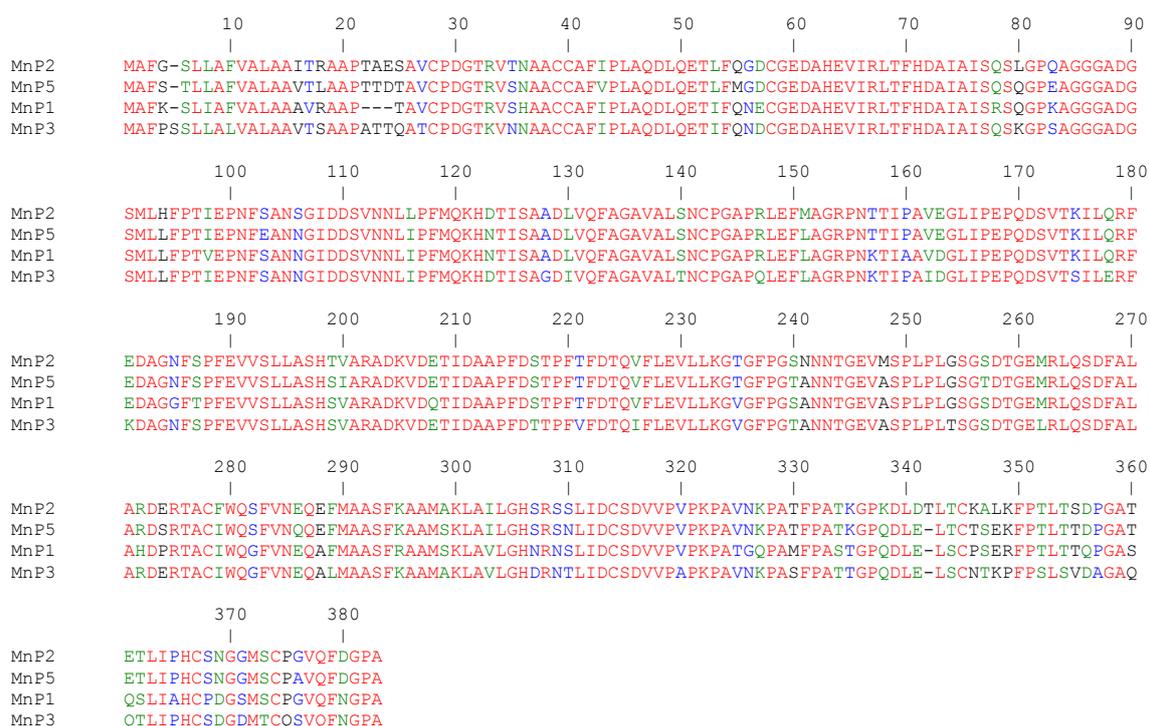
```

-10 agacatcgcaATGCGTTTTCCATCCTCACTCCTCGCTCTGGTGGCTCTTGCTGCAGTTACATCTGCCGCGCGGCCACGA
    M A F P S S L L A L V A L A A V T S A A P A T
71 CCCAGGCCACTTGCCCCGAGGTTACCAAGGTCAACAACGCTGCCTGCTGCGCTTCATACCTgLaagcggcctttcaactc
    T Q A T C P D G T K V N N A A C C A F I P
150 gtcgaaaatgatctttacttattcatttctacagCTTGACAGGATCTTCAGGAGACTATCTCCAGAACGACTGCGGTGA
    L A Q D L Q E T I F Q N D C G
230 AGACGCGCATGAAGTTATTTCGCCCTTACTTTCCgLaagccgaacgcaaattgcgcaaatgccatgctaataattttcccttg
    E D A H E V I R L T F
310 tagACGACGCTATTGCCATTCGCAAAGCAAGGACCGAGCGCgtaagcttatgccgatcttgagagcatttcagatt
    D D A I A I S Q S K G P S A
390 ctgactggggtttcccttgaccagTGGCGGCGGAGCTGACGGCTCCATGTGCTGTTCCCAACATTGAGCCCAACTTCT
    W R R S K R L H A A V P H H D A Q L
470 CTGCCAACACCGGTATCGATGACTCGGTCAACAATCTCATCCGTTTCATGCAAAGCAGCACCATCAGCGCTGGCGAC
    L C Q Q R Y R * L G Q Q S H P V H A K A R H H Q R W R
481 ATCGTCCAGTTCGCCGCGCGCTCGCGCTCACCAACTGTCTTgLaagtcctctcaactccgaacttcatcggttaagtctggc
    H R P V R R R R R A H Q L S
551 acgaatgatatgtatgtagGGTGCGCCGAGCTCGAGTTCTTGCGGGACGCCGAATAAGACAATCCCTGCCATTGATG
    V R R S S S S L R D A R I R Q S L P L M
    Phmp3_qF Phmp3_qR
631 GCCTCATTCCCGAGCCGACGAGCGTGCCTGCTGAGCGCTTCAAGGACGAGGCAACTgcccccttcag
    A S F P S R R T A * R R S W S A S R T Q A T S A R L
711 GTGGTCTCGTGCCTCGCTCCACTCTGTTGCGCGCGAGACAAGGTAGACGAGACCATCGACGCCGCGCCATTCGATACG
    R W S R C S R P T L L R A Q T R T R P S T P R H S I R
891 gtgagagccgcccataactgcccgtctgctgctgactctcgcgcagACGCCGTCGTGTTTCGACACGAGATCTTCC
    D A V R V R H A D L
901 TCGAGGTGCTCCTCAAGGGCGTCGGCTTCCCGGGGACGGCGAACACAGGGCGAGGTCGCGTCCCGCTGCGCTGACGT
    P R G A P Q G R R L P G D G E Q H G R G R V A A A D
971 CGGCGACGACACGGGCGAGCTGCGGCTGCAGTCCGACTTTGCGCTCGCGCGACGAGCGGACGGCGTGCATCTGGCAGG
    V G Q R H G R A A A A V R L C A R A R R A D G V H L A
1051 GCTTCGTCACGAGCAGGCGCTCATGGCCGCGAGCTTCAAGGCCCATGGCGAAGCTCGCCGTGCTCGGGCAGCAGCCGA
    G L R Q R A G A H G R E L Q G R H G E A R R A R A R P
1131 ACACGCTCATCGACTGCAGCGAGCTCGTGCCTGCGGCGGAGCCCGCGTGAACAAGCCGCGAGCTTCCCGCCACCAGG
    Q H A H R L Q R R R A R A E A R R E Q A R E L P R H H
1211 GCCCCAGGACCTCGAGCTCTGTCACACGAGCCGTTCCCGTCTGCTCTGTTGATGgtgtgtctgaccttctctgtg
    G P P G P R A L V Q H E A V P V A L C W
1291 tgggtgtgctggccgctgatgggttttgcctttccagCGGGCGCGCAGCAGCGCTTATCCCGCACTGCTCCGACGGCGA
    A G A Q Q T L I P H C S D G D
1371 CATGACGTGCAGAGCGTCCAGTTCACGGCCCTGCATAAgtctgacgcy
    M T C Q S V Q F N G P A *
    
```

Figura 3.1: Estructura de los genes *mnp*s: a) *mnp1*, b) *mnp2*, c) *mnp3*. El codón de iniciación y terminación y los pie de intrón se indican en sombreado. Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificación se indican con flechas.

	<i>mnp 2</i>	<i>mnp 3</i>	<i>mnp 4</i>	<i>mnp 5</i>
<i>mnp 1</i>	84%	82%	100%	79%
<i>mnp2</i>		80%	84%	81%
<i>mnp 3</i>			82%	77%
<i>mnp4</i>				79%

Tabla 3.1 Homología entre los transcritos *mmps*



	MnP2		MnP3		MnP5	
	Ident.(%)	Simil.(%)	Ident.(%)	Simil.(%)	Ident.(%)	Simil.(%)
MnP1	82,72%	13,35%	81,94%	14,93%	84,78%	13,38%
MnP2			81,46%	14,36%	90,31%	7,59%
MnP3					82,72%	14,66%

Figura 3.2: Similitud entre las proteínas MnP: a) Alineamiento global con ClustalW b) Porcentaje de identidad y similaridad.

Asimismo se analizó la secuencia de la región promotora de cada uno de los genes *mnp*, en busca de elementos putativos de respuesta a los metales: MREs (*metal response elements*). Los MREs son secuencias consenso 5'-TGCRNC-3' que han sido identificadas en promotores de los genes de las

metalotioneínas (*met*) en plantas y animales y también en promotores de hongos filamentosos cuya expresión depende de la presencia de metales (Brown *et al.*, 1991; Thiele, 1992; Gettemy *et al.*, 1998).

Los cinco genes *mnp* presentan una secuencia tipo MREs en su región promotora en las posiciones -319 en *mnp1*, -237 en *mnp2*, -296 en *mnp3*, -321 en *mnp4*, -319 en *mnp5*, del codón de inicio (figura 3.3). Lo que reafirma la idea de que todos estos genes pueden estar regulados por la presencia de metales. Esto es solo un indicio ya que no existe una demostración formal de que estos elementos sean funcionales.

```
> mnp1
TGCATCTGGCAACATATGGAAGGACGCGCGCCGATGGCGGTGCCCTGCCACCGACAGCACTCGCTCTCTACCAAGCGTGCACACCG
AGGGCATTGGCCGACACAGAGGGTGGGGACCCGCATCGCTGGATTATCCCGAGCGATGGGATTCGCCACGATCCCGCCTCGAGCGA
CCCACACTCCTGTGAGTTACGGAATTGGCCGCTCATTATTGGACACTTACGCGAGTCGCTGGCAGCAGCTCCTGATATTTCGTTGGAA
ACTTGGACCGCTGCTGTTGTCGAGGTCAATTATGGCGCGGCCACGCGCAGTATAAAAACCTGGGCGGCTCGACAGAGGTCAGCCAGGA
CATTTTCAGTTCTACCTCCTCCTCCTCCTCGGTCAACGGCTTGGTATCCAGATG
> mnp2
TACGCCAGCGCAGCGACAGCATGGTACGCGTCCCGTCCGACTGGGTCCGGCCACGACAGACGACGCTGTGACCCACAGTCTGTGA
GCTTGCATAACCGGCTCTTCGTTATTGGTGTCTCGCAAGTGGCGCACTGCCCGAGTCATGCTCAATGCCGACGCTCTGGATGTCG
GCAATTGGGCTACCCGACACAACGGTGTATCGCCGCTCCGGACTCAGTAGCCCCACGATCCTGTGAGCTCGCGTGAGTACGTTTCG
TAGTTCGCTCCGAAGGATATTGAAGGAAAAATTAGGCAACACCTTGACGCGAGAGCCAGAGACCTATAAAAAGCTGGGCTGTGCTGGA
GCAGAGTCTTCAGGACATCGAGTTCCCTCTCAGCTCTCAAGGACATCCGCACTCGAATATCGCAATG
> mnp3
GGCACTCCGCGACGAGCCCGTTCGCGCTCCTCAGCTCCTGTGAGCGCTGCAAACCTGGCAAACCGGATTTGGCACCCGCTCGCCGCT
CAAGTCTGATTCACCTCGGTTCTGTCGCGCAACAATAACACACCGATGGGCCATGGCTATTGCAGGCGAGTCAAGTTAGCAGGAT
GGTGTGACGGCATCGAGCTCGCCACCCACAGTCTGTGAGCTGGCCGCGCGATGTACCCATAACTTCGGTACTATGCAACATCTCA
TCCAGCCACATTTCTGAATATCTTACGGTATAAAAAGCTAGACAGAGGCGAGGCTAGAGTGTCTCAGGACAACGAGCTCTCGCCTCGCAC
CTCTTATCCGGACAACCTCATCAAGCCGCTAGCTACTTGAACCGACCACTCAAGACATCGCAATG
> mnp4
CGCTGCCAGCAAACAAGGAAGAAAGCGCGCCGATGGCGATGTTCTGCCCGCTAGTGTCTGTTCTCCCAAGCGTGCACACCG
AGACCAGTGACCGACGACAGAGGGTGGGGCCCGCATCGCTGGATTATCCCGAGCGATGGGATTCGCCACGATCCCGCCTTGAGCGA
CCCACACTCCTGTGAGTTACGGAATTGGCCGCTCATTATTGGACACTTACGCATGTAGCTGGCAGAGCTCCTGATTTTTCGTTGGAA
ACTTGGACCGCTGCTGTTGTCGAGGTCAATTATGGCGCGGCCACGCGCAGTATAAAAACCTAGGCGGCTCGACAGAGGTTGGCCAGGA
CATTCAGTTCTACCTCCTCCTCCTCCTCCTCGGTCAACGGCTTGGTTTTCCAGATG
> mnp5
AACAGACCGTCGGCGCCACCGACACATTGGAATTTACCACGCCCCACCGACTATACCCCTCGGTCGGGTATGGGCTGCGCACCA
TGGGTAGGCTGCTGCCTAATCGACCACTGGGACAGGCCTCGTCAGCGACGCGCGACCCGAAGGAGCGGATGGTACCGCTACTGAGTAT
TCCAGAGCCATACGCCAGGTATATGCCACAGCTCATGCTTACAAAAGCTGTGAATAATCGCATTACCTCCTCCTCCTCCTCCTCGG
TGGCTCACCTCCTGTTTTAGTGCATATCGAGGCAACGTATAAAAAGCTGGAGAGATGCTGCGACCAACTCCAGAGTTCCGCCGCCCC
TCTCCATCCAAAACGCGAGCTACCGACCTCCACTCCCAATACCAAGTGTCTCCATG
```

Figura 3.3: Regiones promotoras de los cinco genes *mnp*s, donde se ubican las secuencias consenso correspondientes a los MREs. 410 pb antes del codón de inicio de la secuencia codificante.

Por otra parte se buscaron las secuencias de genes candidatos a ser utilizados como genes de referencia. El denominado gen de referencia es un gen de expresión constitutiva (*housekeeping gene*) usado como control interno, con el fin de estimar los niveles de expresión de los genes de interés. La normalización de los resultados a un gen de referencia asegura idénticas condiciones iniciales en el ensayo corrigiendo las variaciones de cantidad de material utilizado entre muestras. Además la eficiencia de amplificación del gen de referencia y del gen de interés deben ser similares (Szabo *et al.*, 2004; Pfaffl, 2007). Por estas razones en general se ensaya más de un gen de referencia. Se eligieron dos genes: i) *gpd* que codifica la gliceraldehído 3 – fosfato deshidrogenasa, enzima que juega un importante rol en la glicólisis y la gluconeogénesis, por catalizar reversiblemente la oxidación y la fosforilación de D-gliceraldehído 3 – fosfato a 1,3 – difosfoglicerato; ii) β – act, que codifica la β – actina, es un componente

estructural del citoesqueleto. Ambos utilizados en estudios de expresión con basidiomycetes (Bogan *et al.*, 1996; Gettemy *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2004; Kamai *et al.*, 2008).

Al igual que para los genes *mnps*, se identificaron las secuencias genómicas (*gpd*, id 132198; β -*act*, id 39298) y se estableció la estructura de los genes identificando las zonas codificantes (figuras 3.4 a y b).

a)

```

-10  catccacaaaGGTCGTATTGGCCGTATCGTCTCCGTAATGCTCTCCTTCACGGAGACATTGACGTCGTC
      M L S F T E T L T S S
61    GCGCTCAACGAgtaccctcctcctcaagtccccggttactcaggagcgcgttctgacgccctaaaccttacc
      P S T S
131  ttagCCCCCTCATTGACCTCGAGTACATGgtatgtccagttttctacgcgtcgctacccccacagcgatgg
      A P S L T S S T W
201  cgattgcaagcaaagcccgcgctgacgcgtgtgcttcagGTCTACATGTTCAAGTACGACTCCGTT
      S T C S S T T P F
271  CACGGTCGCTTCAAGGGTCCGTCGAGGCCAAGGACGGCAAGCTCATGTCGAGGGCAAGCCTATCCACG
      T V A S R V P S R P R T A S S M S R A S L S T
341  TCTTCGCTGAGAAGGACCCGGCCAACATCCCCTGGGGCTCTGTCCGGCTGAGTACATCGTTCGAGTCGAC
      S S L R R T R P T S P G A L S A L S T S S S R
411  CCGTGTGTTACCACCACCGAGAAGGCTCTGCCACTTGAAGGGCGTGCCAAGAAGTATCATCTCG
      P V C S P P P R R P L P T * R A V P R R S S S R
481  GCCCCCTGCTGATGCCCCATGTTTGTCTGCGGTGTCACCTCGACGCTACGACTCCAAGTACAAGG
      P P L L M P P C L S A V S T S T R T T P S T R
551  TCATCGAAGCGCTCTGCACCACCAACTGCTTGGCGCCCTTGCCAAGGTCATCCACGACAAGTTCGG
      S S R T R P A P P T A W R P L P R S S T T S S

      Phgpd qF1
621  CATTGTCGAGGGTCTCATGACCACCGTCCACGCTACCACCGCTACCAGAAGACCGTCGATGGCCCTCG
      A L S R V S P P S T L P P L P R R P S M A P R
691  AACAAAGACTGGCGTGGTGGCCGTTCCGTCGGCAACAACATCATCCCCTCGTGCAGTGGTGGCCCAAGG
      T R T G V V A V P S A T T S S P R R L V P P R

      Phgpd qR1
761  CCGTCGGCAAGGTCATCCCCTTCGCTCAACGGCAAGCTGACgtggctttactactcatgtgatttcgacgc
      P S A R S S L R S T A S A
831  gtgctaacggactcccagCGTCTCGCCTTCCGTGTCGCCACCCGTCGATGCTCCGTCGTCGACCTCG
      R S R L P C P H R R C L R R R P
901  TCGTCCGCTCGAGAAGCCCGCTTCTTACGACGAGATCAAGCAGGCCATCAAGGAGCGTCCGAGACCAC
      R P S R E A R F L R R D Q A G H Q G G V R D H
971  CCACAAGGCATCCTCGGTACACCGAGGAGAAGTTCGCTCCACCGACTTCCCGCAACGACAACCTCG
      P Q G H P R L H R G E G R L H R Q R Q L
1041 TCGATCTTCGATGCTGACGCGGGTATCGCGCTCAACAAGAACTTCGTCGATCATCTCCTGGTACGACA
      V D L R C R R G Y R A Q Q E L R Q A H L L V R
1111 ACGAGTGGGGTACTCCCGCGTCTGCGACCTCCTCGGTACCGCGAAGGTCGACGGTGGCCCTCTA
      Q R V G L L P P C L R P P R V R R E G R R C P
1181 Agcgtcgctca
      L
    
```

b)

```

-10  CAACCAACTAGTACACTACAATGAGGACGAGGTCGCTGCTCTGgtaccgtagcccacttgttccgacgcgatatgacag
      M E D E V A A L
61  atcccaacggttcgaggccatgttagGTTATTGACAACGGTTCGGCATGTGCAAGGCTGGCTgtatgtatcctgtctcgtc
      V I D N G S G M C K A G C
131  tacgttcgatcctcactgattcgatctctcttcTTGCTGgtatgcatgacaattctctgtcgcgatagacaacc
      L L
201  tetgaatgctgtgtagGTGACGATGCTCCCGTGCCTGTTCCgttaagtgcttcgctatcggtttccatgtgatgat
      G D D A P R A V F
271  gtgtcaaacatgcacccaagATCCATCGTTGGTCCGCTCGTATCAGGGTGTGATGGTGGAAATGGCCAGAAGGACT
      I H R W S P S S S G C D G W N G P E G L

      Phact qF1
341  CTTACGTCGGgtaaagtgagcgcgcttgccgcacttagatcccccttctaactcctggtgcagTGATGAGGCTCAGTCC
      L R R * * G S V
411  AAACGTGGTATCTTGACCCCAAGTACCCATTGAGCACGGTATCGTCAACCACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCA
      E T W Y L D P Q V P H A R Y R H Q L G R H G E D L A P
481  CCACACTTCTACAATGAGCTCCGTGTCGCGCCAGAGGACACCCCGTCTCCTCACTGAGGCCCGCTTAACCCCAAGG
      H L L Q A P C R A R G A P R P P H G P A P Q G P E
551  CTAACCGTGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTCGAGACCTTCAACGCGCCAGCGTCTACGTCGCCATCCAGCCGCTCTC
      D D P D H V R D L Q R A S V L R R H P G R P L A V R
621  TCGCTGTACGCTTCCGGTTCGTCACAACGGGTATCGTCTCGACTCTGGTATGGTGTCTCGCACACTTACCCATCTACGA
      F R S Y N G Y R A R L W * W C L A H C T H L R G F R
691  GGGTTTCGCTCTCCCCACGCCATCCTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCT
      S P R H P S S * P C W P * P H G P P C Q E D G A
761  TGGAGCGCGTTACCCCTTCAACACCACAGCCGAGGCTGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTCGCC
      R L P L Q H H S R A N R P H Q G E A L L R R
831  CTCGACTTCGAGCAGGACTCCAGACCGCTGCGCACTCGTCTGCCATCGAGAAGTCTACGAGCTTCCCGACGGTCAGGT
      P R L R A G A P D R C A L V C H R E V L R A S R R S G
901  CATCACCATCGGCAACGAGGgtaccctcatatttccggtccgagtggtggcgcttaccgatttacctgtgattggcttagt
      H H H R Q R A V
971  TTCGGTGGCCAGAGGCTCTTCCAGCCCGCTTCTGGGTCTTGAAGTGTGTTATCCACGAGACGAGgtgagatc
      S V R Q R L S S S P R S W V L K L L V S T R R
1041 ccggtgtatgtccgcgggcagctatctgacattcaatcttagCTACAACCTCCATCTACAAGTTCGATTCGATATTCGTC
      A T T P S T S A I S I F V
    
```

```

1111 GTGACCTCTACGGCAACATCGTCCTCCTCCGGTGGTACCACTATGTTCCCGGGTATCGCCGACCGTATGCAGAAGGAGCTC
    V T S T A T S S S P V V P L C S R V S P T V C R R S S
1181 ACCGCCCTTGACCTTCAAGCATGAAGgttcgtctctccgcgactatcaggctgtcgagctgctcgttgactcttcgctgtg
    P P L H L Q A * R
1251 taagagGTC AAGATCGTTGCTCCTCCGAGCGGAAGTACTCCGCTCGGATCGGTGGTCCATTTCGCGTCGCTTTCGAC
    G Q D R C S S R A E V L R L D R W F H S R V A F D
1321 CTTCAGAACCTCTGGTGC TCGAAGCAGGAGTACGACGAGTCTGGTCCCTGGTATCGTTACCCGAGTACGTATCAATCAT
    L P E P L V L E A G V R R V W S W Y R S P Q Y V S I I
1391 TATTTATTGTCGCTGCCGTCGCTCACATCGCCCGCAGAGTGCCTTAAGCCCATGCCAAAACATGATGGAGGGTTAAT
    I Y C R C R R S H R P A E C F * A P C E N * W R G *
1461 GAAAGTCGCTGCAGTAGAAATCCATATACGCTACGTTACGCCCTCGGTGCGCTTTCCTTTAGTTTCAGTGCACGCTGCG
    * K S L Q * K S I Y A T L R P R S L F L * F Q C T P A
1531 GCTCTATTTTGATATCTCTGTCTTGGCGTACTCTCGAGTTGGGTGAGGTGCGGATTACATAGTCGAACGCAAAGAAGAA
    A L F * Y L L S C R T L E L G E V R I T * S N A K K K
1591 ATACGGAATTTGTAATCAATATACTACTGCTACGGACTCGTGTGAagcagggcatgcttcatgtgt
    Y G I C K S I Y Y W Y G L V L K

```

Figura 3.4: a) Estructura del gen *gpd*; b) Estructura del gen β -*act*: El codón de iniciación y terminación y los pie de intrón se indican en sombreado. Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificación se indican con flechas.

3.1.1.2 Diseño de oligonucleótidos para cuantificación de *mnps*, *act* y *gpd* por qPCR.

En cualquier reacción de PCR, el correcto diseño de los oligonucleótidos y las condiciones de reacción adecuadas conducen a óptimos resultados. Si bien las características específicas de los oligonucleótidos dependen de los objetivos buscados, en el caso particular de las reacciones de PCR en tiempo real, existe una serie de parámetros que son cruciales en el diseño y validación de los oligonucleótidos. Ellos son: la longitud del oligonucleótido debe rondar los 20 pb; los amplicones deben ser pequeños (80 - 100 pb); las temperaturas de fusión de un par de oligonucleótidos no deben diferir en más de dos grados; estando siempre comprendidas en el rango de 52 – 66°C; que no formen dímeros ni estructuras internas con $dG < 0$, ya que así disminuiría el rendimiento de la cuantificación; por último las eficiencias de los genes en estudio deben ser similares, todas mayores a 90%.

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar el gen *gpd*, se realizó con el *software Primer3Plus* (Rozen & Skaletsky, 2000; <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). En el programa se ajustó solamente el tamaño del amplicón (80 – 100 pb), empleándose los demás parámetros que el programa fija por defecto. Luego se verificó que la secuencia a amplificar fuera única en el genoma de *P. chrysosporium* a través de un Blast del amplicón en el genoma. La figura 3.5 a, representa la secuencia del gen *gpd*, en la que se pueden ver los oligonucleótidos diseñados.

Los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen de la β -*act*, se tomaron de la bibliografía (Yoshida *et al*, 2004), donde se emplea como gen de referencia en el análisis del transcripto de glucosidasas y celulasas de *P. chrysosporium* por PCR cuantitativa en tiempo real (figura 3.4 b).

Debido a la alta homología de los genes *mnps* los oligonucleótidos se diseñaron manualmente eligiendo regiones con mayores diferencias entre secuencias. El par *Pchr_mnp1*, mide la expresión de *mnp1* y *mnp4* que son genes de muy alta homología y *Pchr_mnp2* mide la expresión de *mnp2* y *mnp5*. En aquellos casos en los que las diferencias no alcanzan a 20 nucleótidos requeridos para un

oligonucleótido, este se ubicó de forma que la región 3' del mismo no fuera compartida por diferentes genes (figura 3.5).

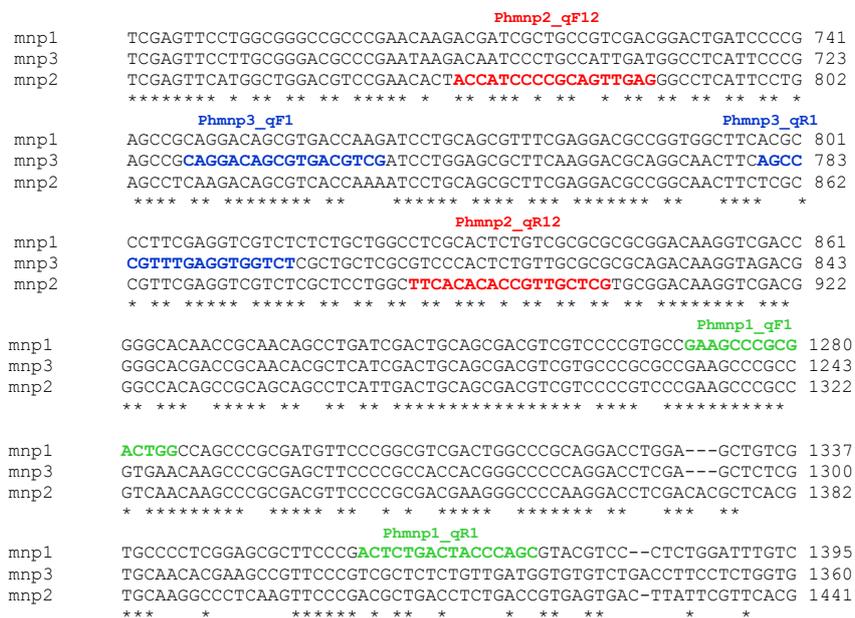


Figura 3.5: Alineamiento global de las *mnp*s. Se ubican los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por qPCR.

Para todos los pares de oligonucleótidos diseñados se calculó el %GC, la temperatura de fusión teórica por medio de la ecuación $T_m = [2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)]$, y se analizó la formación de heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias con el analizador de oligonucleótidos perteneciente al programa Vector NTI. Sólo los oligonucleótidos para amplificar actina, presentaban la posibilidad de formación de dímeros u horquillas (Materiales y Métodos).

Todos los oligonucleótidos fueron validados respecto a su capacidad de amplificación y su especificidad. Inicialmente, se ensayaron por PCR convencional usando como molde ADN genómico. Se obtuvo un único amplicón del tamaño esperado para cada uno de los siguientes fragmentos: 70 pb (*mnp3*), 90 pb (*gpd*), 100 pb (*mnp1*) y 134 (*mnp2*) (figura 3.6). Los oligonucleótidos para la actina no amplificaron el ADN, debido a que la secuencia de ambos cebadores es interrumpida por la presencia de dos intrones (en el *forward* y en el *reverse*) que interfirieron en la hibridación de cada uno de ellos. Por tanto, estos oligonucleótidos debieron validarse utilizando ADNcopia.

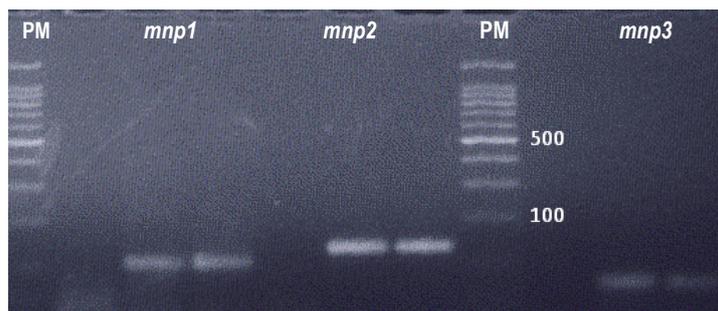


Figura 3.6: Amplificación de los genes *mnp1*, *mnp2* y *mnp3* de *P. chrysosporium*. Electroforesis en gel de agarosa 2,5% con EtBr de los productos de PCR convencional (molde ADNg). PM: marcador de peso molecular (Promega, 100pb DNA Ladder)

En una segunda etapa, se validó el funcionamiento de los oligonucleótidos por PCR en tiempo real y sobre el molde de ADNc. El proceso de obtención del ADNc molde implica: i) la extracción del ARN total de cada cultivo; ii) la eliminación del ADN genómico contaminante con un tratamiento con ADNasa. La mayoría de las preparaciones de ARN están contaminadas con muy bajos niveles de ADN que, si bien no interfiere en otras técnicas de medición de ARN, es crucial en este método (Pfaffl, 2004). iii) La síntesis del ADNc por transcripción reversa utilizando *random primers* (Materiales y Métodos). Cada una de estas etapas es fuente de variabilidad y fueron optimizadas en nuestro laboratorio para este tipo de muestras en un trabajo previo al presente (Barraco, 2009).

Los oligonucleótidos fueron entonces empleados para amplificar, por PCR en tiempo real, el ADNc así obtenido, el ADN genómico y controles sin ADN. En todos los casos la amplificación fue detectable, con excepción del ADNg de actina por las razones antes mencionadas (figura 3.7). En ningún caso se detectó fluorescencia en los controles negativos. Obsérvese que para todos los ensayos con ADNg la fluorescencia es detectable antes que para aquellos en los que el molde es el ADNc. Esto se debe simplemente a que la cantidad de ADNg de partida es mayor a la de ADNc. En las curvas de un único amplicón a partir de cada molde

La especificidad de la amplificación ya vista en el gel de agarosa, se confirma a través del análisis de las curvas de fusión obtenida en la amplificación por qPCR ($-(dF/dT)$ versus T). La fluorescencia se produce al intercalarse el SYBR Green en ADN doble hebra por lo tanto es proporcional a la cantidad de amplicones producidos y al tamaño de los mismos. Las curvas de fusión representan la dependencia de la variación de la fluorescencia con la temperatura producto de la disociación de la doble hebra del ADN. Por lo tanto cada amplicón tendrá un máximo de fluorescencia en la curva de disociación (derivada primera de la curva de fusión). Para todos los ensayos se observa un único pico, no observándose picos adicionales, indicativo de que no hay amplificaciones inespecíficas ni formación de dímeros o estructuras secundarias de los oligonucleótidos.

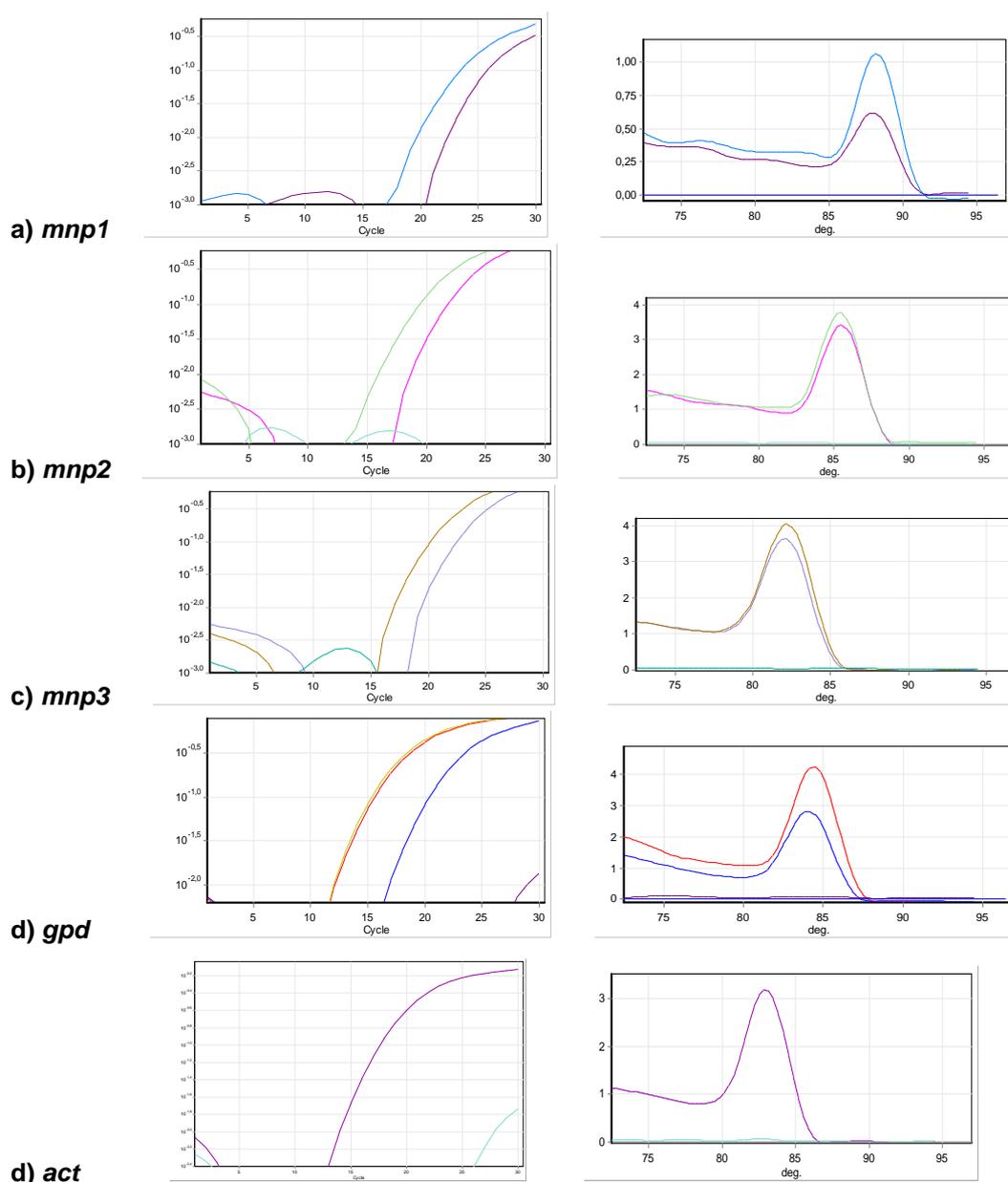


Figura 3.7: Amplificación por PCR en tiempo real de con los distintos oligonucleótidos ensayados: Izquierda: curva de amplificación. Derecha: derivada primera de curva de fusión. ADNg (curva con menor Ct) y ADNc (mayor Ct). Obsérvese que en la *act*, el ADNg no amplifica, sólo está la curva de ADNc.

El último paso de la validación de la amplificación es confirmar la secuencia de los productos de PCR obtenidos. En el caso de los genes *mnp* es particularmente importante, ya que si bien los oligonucleótidos diseñados generan amplicones de diferente tamaño (PM) para cada gen, la alta similitud entre las secuencias exige verificar que el fragmento obtenido corresponde al gen para el cual fue diseñado.

Por lo tanto los amplicones obtenidos a partir de ADNc fueron purificados de un gel de agarosa (figura 3.8) y clonados en el vector pCR2.1 (*Invitrogen Corp.*) por ligación y posterior transformación de

Escherichia coli TOP10. Se verificó la presencia de los amplicones para varios clones de cada gen por PCR directa (sin previa extracción del ADN) y dos o tres de cada gen fueron enviados a secuenciar (Materiales y Métodos).

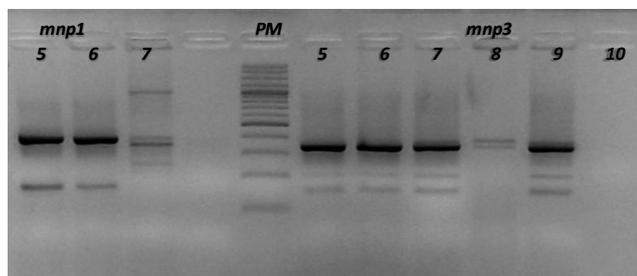


Figura 3.8: PCR directa para algunos de los clones de los genes *mnp1* (5, 6 y 7) y *mnp3* (5, 6, 7, 8, 9,10) de *P. chrysosporium*. Electroforesis en gel de agarosa 2,5% con EtBr de los productos de PCR directa.

Las secuencias obtenidas tienen 100% de homología con las secuencias teóricas de *mnp1*, *mnp2*, *mnp3*, *gpd* y *act*. Por lo tanto, los oligonucleótidos diseñados eran adecuados para el estudio de expresión de las *mnp*s, no existían superposiciones entre las secuencias de los amplicones y se podían diferenciar las 3 isoenzimas a pesar de la alta homología que presentan.

3.1.1.3 Determinación de la eficiencia de amplificación.

La eficiencia de amplificación es un parámetro indispensable para determinar la cantidad de producto de partida. Es afectada por un gran número de variables como por ejemplo el largo de los amplicones, la presencia de inhibidores, la afinidad de los oligonucleótidos por el ADN, y la formación de estructuras secundarias (dímeros u horquillas). La eficiencia puede ser calculada graficando los valores de C_t en función de la concentración del ADN molde, como $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$ y su valor debe ser entre 0,9 y 1,1.

Para cada par de oligonucleótidos, se hicieron dos curvas independientes empleando diluciones de ADN seriadas al cuarto. Todos los puntos de cada curva se hicieron por triplicado y se consideraron aceptables aquellos valores de C_t que difirieren en menos de 0,5 (figura 3.9). Se consideró válida toda amplificación con valores cercanos a 1, y R^2 por encima del 90%, valores aceptados como indicadores de eficiencia y especificidad del ensayo así como indicativos del rango dinámico (Bustin & Nolan, 2004).

Los valores de eficiencia obtenidos son $E_{mnp1} = 1,02 \pm 0,01$, $E_{mnp2} = 1,01 \pm 0,01$, $E_{mnp3} = 1,02 \pm 0,01$, $E_{gpd} = 1,01 \pm 0,05$ y $E_{act} = 0,94 \pm 0,03$ con coeficientes de determinación mayores 0,99, determinados a un valor umbral de 0.02.

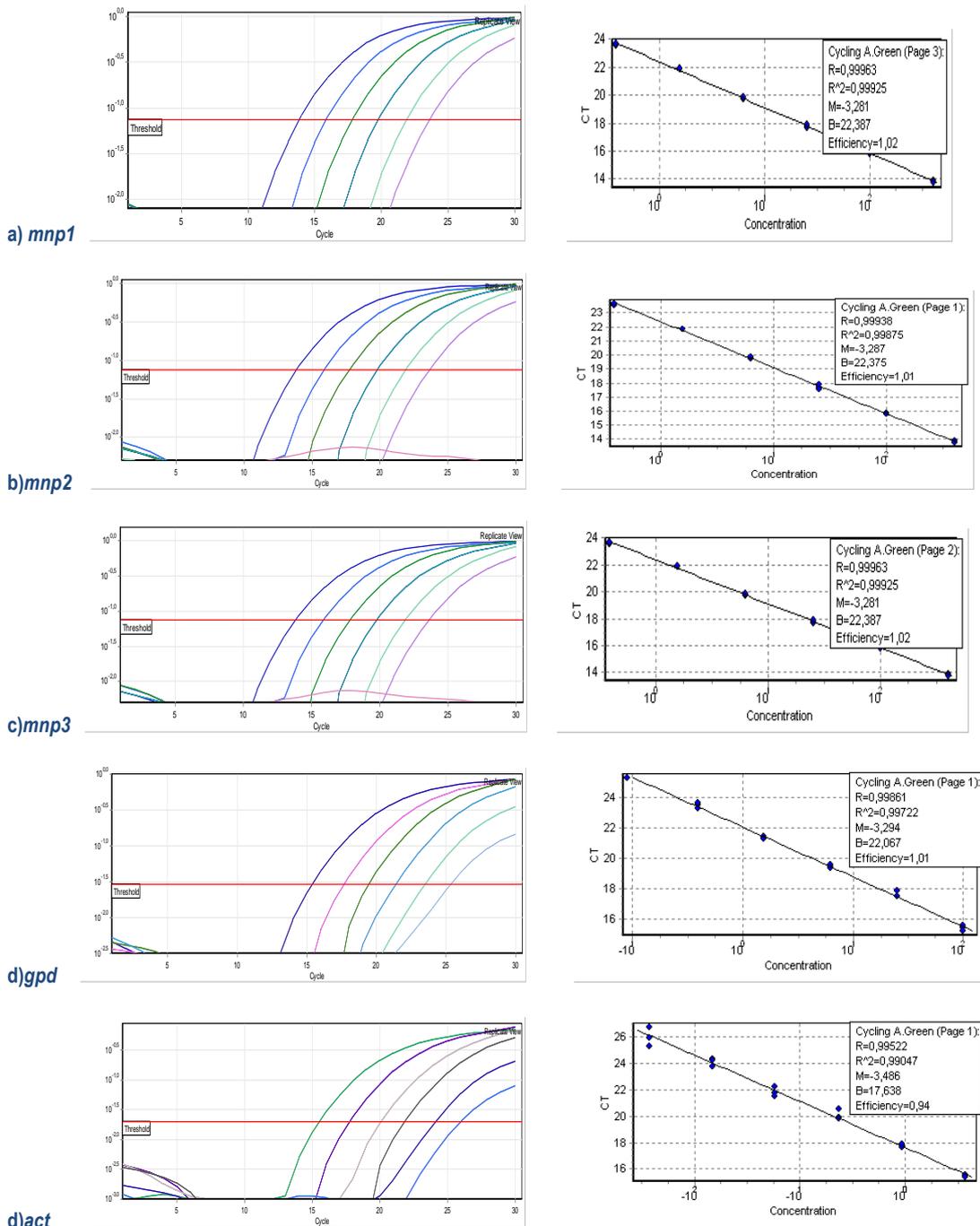


Figura 3.9: Determinación de eficiencias de amplificación de genes de *P. chrysosporium*. Izquierda: Curvas de amplificación, a partir de ADNc diluciones al cuarto. Derecha: curvas de correlación.

En resumen, todos los oligonucleótidos cumplen con los requisitos. Los oligonucleótidos para *gpd* y *act* permiten utilizar cualquiera de estos genes como control interno. Sin embargo, se eligió el gen *gpd* por presentar una eficiencia más próxima a la presentada por los genes *mnp* y porque permite usar ADNg como control de amplificación.

3.1.2 Identificación de peroxidasa de *Punctularia atropurpurascens*

Poco se sabe de *P. atropurpurascens*, no hay genes identificados y no se conoce la secuencia de su genoma, por lo tanto el trabajo comenzó con la identificación y clonado de todos los genes *mnps* y del gen *gpd* (gen de referencia), los que fueron secuenciados, para luego diseñar los oligonucleótidos para los estudios de expresión.

3.1.2.1 Clonado parcial de los genes *mnps* de *P. atropurpurascens* y análisis de las proteínas putativas.

El clonado se realizó con la amplificación con oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de zonas conservadas en proteínas MnP de otros microorganismos. Las secuencias de proteínas funcionales MnPs de distintas especies de hongos descomponedores de madera fueron identificadas a partir de la base de datos *Gen Bank* (*National Center for Biotechnology Information*). Se eliminaron las redundancias dejando una secuencia completa de cada gen, obteniendo finalmente un grupo de 25 proteínas (tabla 3.2).

Organismo	Cantidad	Abreviatura	Id
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	4	Pchr1 Pchr2 Pchr3 Pchr5	AAA33744 AAA33745 AAB39652 Q02567
<i>Phlebia radiata</i>	4	Prad19 Prad2 Prad3 Prad95	ABR66918 BAG12561 BAG12562 CAC84573
<i>Dichomitus squalens</i>	2	Dsqu1 Dsqu2	AAF31329 AAF31330
<i>Phanerochaete sordida</i>	3	Psor1 Psor2 Psor3	BAC06185 BAC06186 BAC06187
<i>Cerioporiopsis subvermispora</i>	3	CsubA Csub23 Csub25	AAO617 AAD45724 AAD45725
<i>Cerioporiopsis rivulosa</i>	1	Criv	ABB83812
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	Post	BAA33449
<i>Trametes versicolor</i>	2	Tver1 Tver4	AAT90348 CAG33918
<i>Agaricus bisporus</i>	1	Abis	CAG27835
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	1	Ppul	AAX40734
<i>Lentinus edodes</i>	3	Led79 Led81 Led09	BAG72079 BAG72082 BAE79199

Tabla 3.2: Proteínas MnP de distintas especies de hongos descomponedores de madera.

Se hizo el alineamiento global de estas secuencias mediante ClustalW (*Network Protein Sequence Analysis*, http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl) (figura 3.10) y se construyó un árbol de similitud que permite ver las distancias relativas entre las secuencias aminoacídicas (programa MEGA versión 4, Tamura *et al.*, 2007, figura 3.11). No evidencia motivos conservados en la totalidad de

las proteínas, sino que se definen grupos de proteínas con zonas conservadas a lo largo de los 410 aminoácidos.

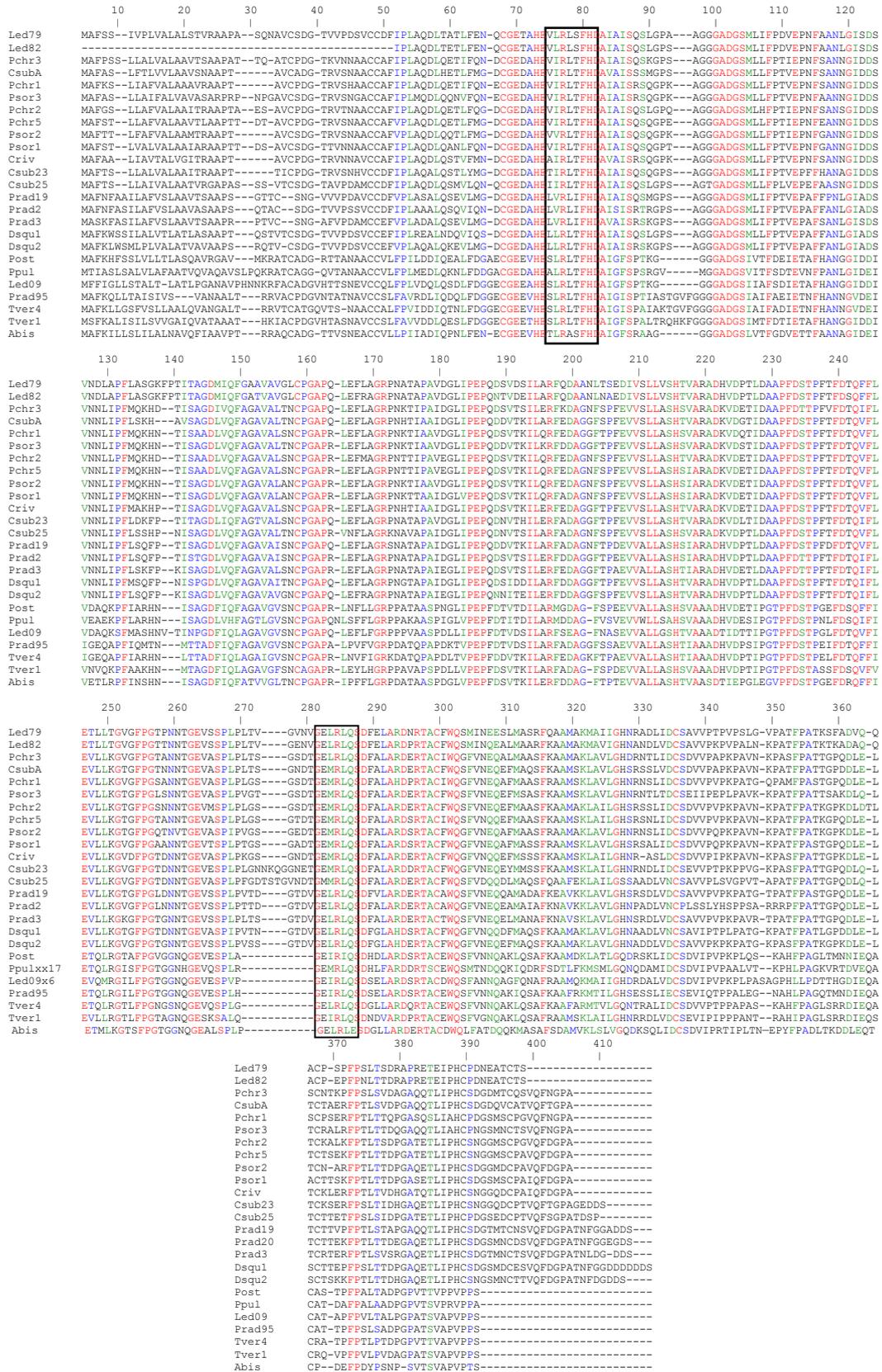


Figura 3.10: Alineamiento de las 25 proteínas seleccionadas para el estudio. En los recuadros se indican las zonas conservadas donde se diseñaron los oligonucleótidos.

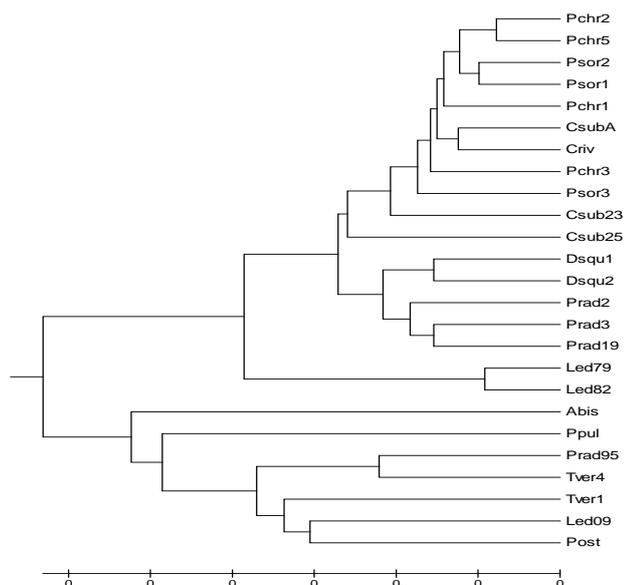


Figura 3.11: Árbol de similitud de las secuencias aminoacídicas de las 25 proteínas.

En el árbol de similitud se observan dos grandes *clusters* que coinciden con los grupos del alineamiento previo (18 primeras proteínas del alineamiento coinciden con *cluster* superior del árbol).

Luego se analizó la taxonomía de los basidiomycetes cuyas proteínas se utilizan en el diseño, hallándose que pertenecen a tres Ordenes, dentro de los cuales hay distintas Familias: Orden Polyporales, Familia Polyporaceae (*Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor*); Orden Corticiales, Familia Corticiaceae (*Phanerochaete sordida*, *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurascens*) y Orden Agaricales, 3 Familias: Marasmiaceae (*Lentinula edodes*), Pleurotaceae (*Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus*, Agaricaceae (*Agaricus bisporus*), Hapalopilaceae (*Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*).

Simultáneamente se analizó la relación filogenética entre las especies de basidiomycetes con el objetivo de dar mayor peso a aquellas secuencias correspondientes a especies más próximas a *P. atropurascens*. Se identificaron las secuencias de las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de todas las especies a partir de secuencias publicadas en el Gen Bank. No se encontraron las secuencias correspondientes a *Dichomitus squalens* y *Agaricus bisporus*. Con todas las secuencias disponibles y la correspondiente a *P. atropurascens*, que fuera secuenciada en trabajos previos en nuestro laboratorio (Mariana Richero, comunicación personal), se construyó un árbol filogenético (figura 3.12). En este árbol se observa que *C. subvermispora* es la especie más alejada y que *P. atropurascens* forma un *cluster* con *P. chrysosporium*, *P. sordida*, *P. radiata*, *C. rivulosa* y *T. versicolor*. A excepción de *C. rivulosa* todos pertenecen a los Ordenes Polyporales y Corticiales.

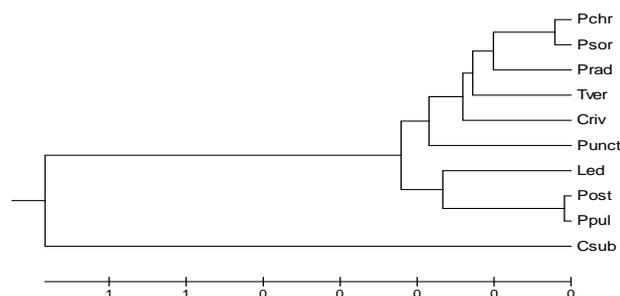


Figura 3.12: Árbol filogenético de las regiones ITS de los hongos seleccionados.

En consecuencia se eligieron dos motivos conservados lo más alejados posible entre sí, tratando de abarcar la mayor extensión de la proteína (265 aminoácidos) considerando las 25 proteínas. Para ambos motivos se buscaron las correspondientes secuencias nucleotídicas de cada proteína/organismo. Los oligonucleótidos se diseñaron manteniendo aquellos nucleótidos conservados y restringiendo las degeneraciones en función de la frecuencia de aparición de las bases y dando mayor peso al sesgo de uso de codones que muestren los organismos filogenéticamente más próximos.

Los fragmentos de interés se amplificaron a partir de ADN genómico, mediante PCR convencional con gradiente de temperatura de *annealing* 61 - 69°C, rango delimitado por las T_m de los oligonucleótidos. Los fragmentos obtenidos (750 y 1200 pb, figura 3.13) fueron purificados, clonados en el vector pCR2.1 (*Invitrogen Corp.*) y secuenciados a partir de oligonucleótidos del vector (Materiales y Métodos).

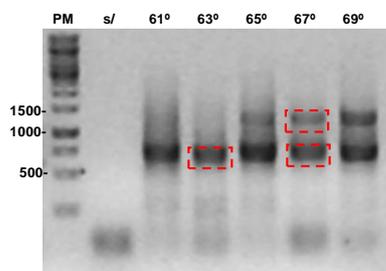


Figura 3.13: Amplificación de *mnps* en gradiente de temperatura de *annealing* (°C). PM, marcador de peso molecular (Promega 1 kb DNA Ladder). Se indican las bandas purificadas.

Se analizó un total de 57 clones; aquellos con inserto de 1200 pb, no presentaron homología con genes *mnps*, en tanto aquellos con inserto de 750 pb, presentaron homología significativa (29 clones). La secuencia de éstos últimos se analizó por homología entre ellos (alineamiento global *Clustal* y *local Blast*) y con las secuencias del *GenBank* (NCBI, *Blastxt*). La disponibilidad de 3 o más clones de cada gen, secuenciados en ambos sentidos, permitió corregir los nucleótidos dudosos (errores puntuales de amplificación). Utilizando el programa Vector NTI y basados en las zonas con alta similitud con proteínas manganeso-peroxidadas (*Blastxt NCBI*) se identificaron los marcos de lectura y establecieron

los intrones, deduciendo así las proteínas codificadas. En función las similitudes encontradas, los clones se organizaron en siete grupos (A, B1, B2, C, D, E y F) cada uno de los cuales representa en principio un gen. Los genes *PatrB1* y *PatrB2* codifican proteínas que difieren únicamente en dos aminoácidos, pero muestran diferencias fundamentalmente a nivel de los intrones (figura 3.14). Dado que los genes han sido clonados parcialmente (200 residuos de proteínas de tamaño de 380 residuos aproximadamente), podrían encontrarse diferencias fuera de esta zona que conduzcan a definir nuevos genes.

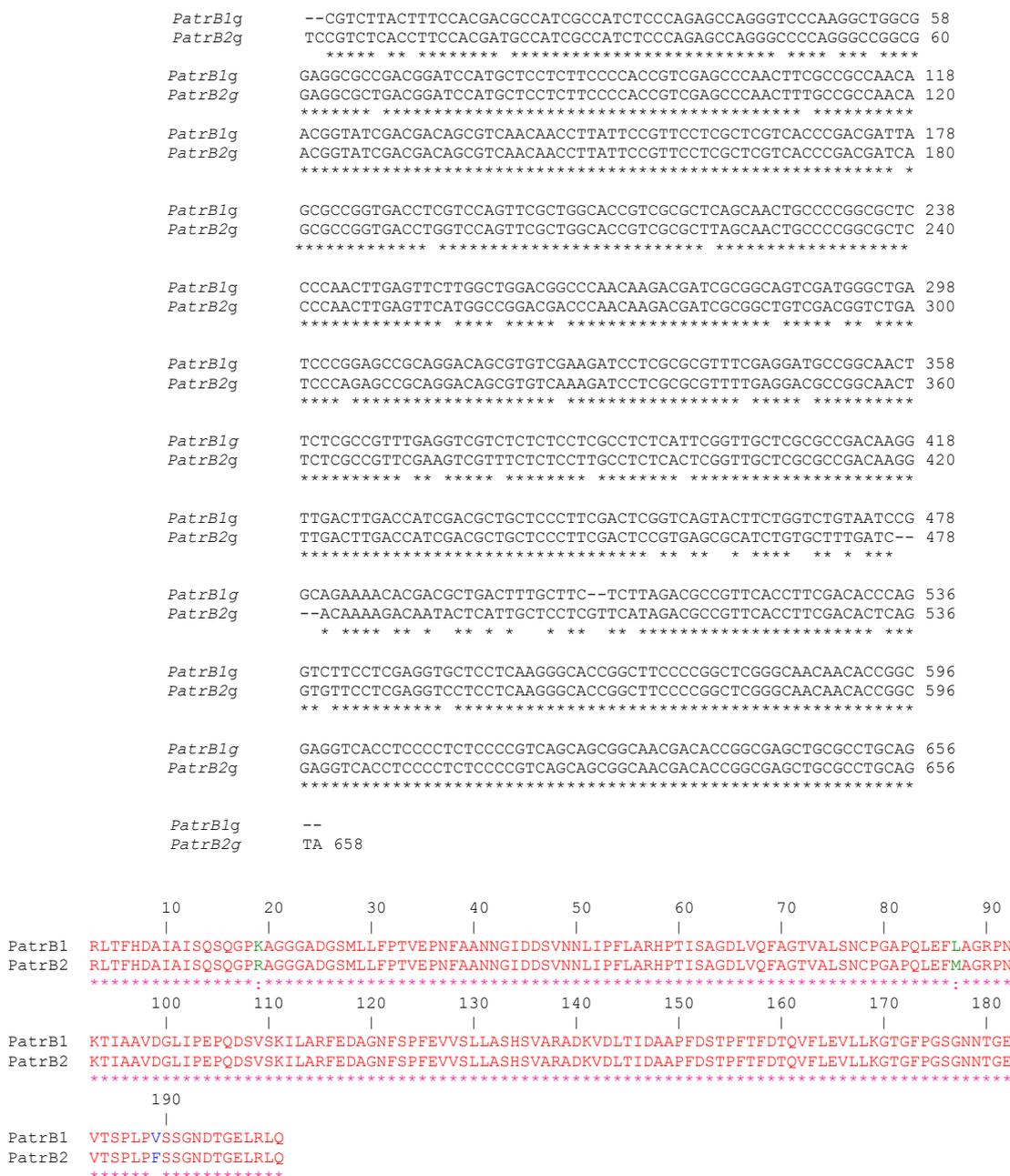


Figura 3.14: Secuencias *PatrB1* y *PatrB2*. a) Alineamiento de secuencias genómicas. En minúsculas se indica el intrón. b) Alineamiento de péptidos deducidos.

La identidad entre los péptidos deducidos es alta, exceptuando a PatrD y PatrE. Se verifica además que las proteínas PatrA, PatrC y PatrE, están próximas (identidad 73,2%, similitud 12,4%) y en el árbol de similitud se las puede apreciar en un *cluster* junto a las proteínas PatrB1, PatrB2, PatrF y las MnPs de *P.chrysosporium*. Solo la proteína PatrD de *P.atropurpurascens*, está alejada y agrupada con aquella proteínas del alineamiento inicial (figura 3.10) que presentaban mayores variaciones en los motivos conservados (tabla 3.3, figura 3.15).

	PatrB1		PatrB2		PatrC		PatrD		PatrE		PatrE	
	Id (%)	Sim (%)										
PatrA	88,9	7,0	87,9	8,0	85,4	7,1	59,1	15,2	79,8	9,1	87,9	7,0
PatrB1			98,5	1,0	88,4	5,0	59,8	14,6	76,7	11,1	90,5	7,0
PatrB2					87,4	6,0	59,8	14,6	75,4	12,1	91,5	6,0
PatrC									77,8	10,6	84,9	7,0
PatrD									55,0	18,7	60,3	14,6
PatrE											76,4	11,2

Tabla 3.3: Porcentaje de identidad y similitud entre los péptidos deducidos.

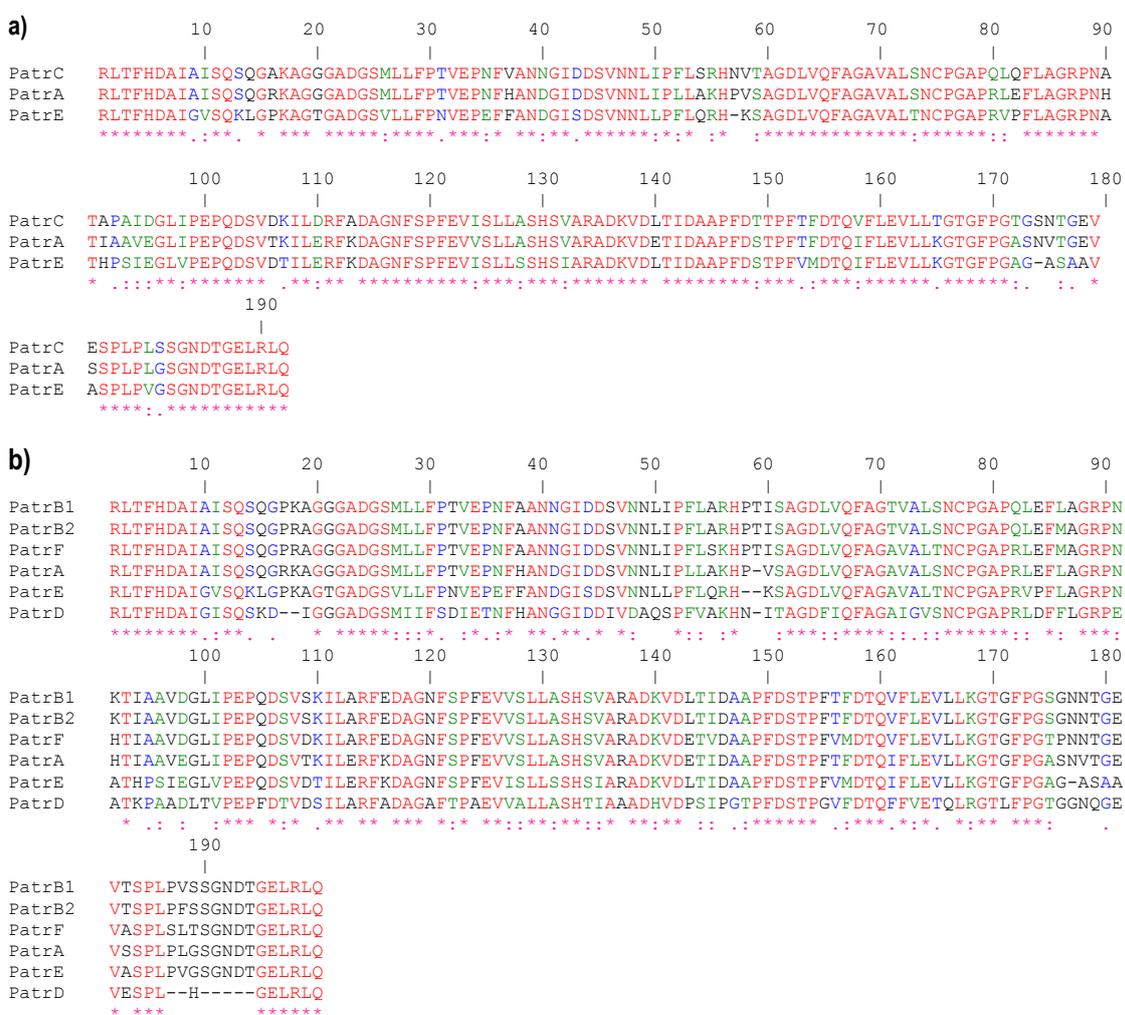


Figura 3.15 Comparación de péptidos deducidos de *P. atropurpurascens*. a) Alineamiento PatrA, PatrC y PatrE. b) Alineamiento de todas.

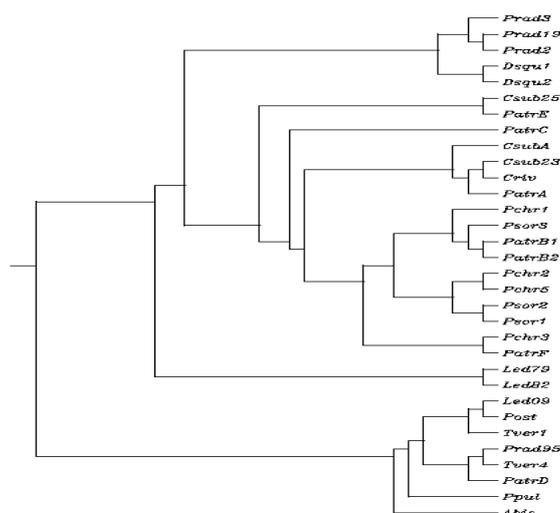


Figura 3.16: Árbol de similitud entre las 25 proteínas y los 7 péptidos deducidos de *P.atropurpurascens*.

La estructura molecular de las manganeso peroxidasas presenta motivos y residuos conservados que forman su sitio activo, el sitio de unión al Mn^{2+} , los sitios de unión a dos iones Ca^{2+} , un grupo hemo y cinco puentes disulfuro que han sido confirmados por estudios cristalográficos, mutagénicos, biofísicos y cinéticos (Sundaramoorthy *et al.*, 1994, 2005, 2010). Como forma de confirmar que los péptidos deducidos de *P. atropurpurascens* tiene las características de la familia de proteínas manganeso peroxidasas, se buscaron los residuos conservados que deben estar en la zona clonada (figura 3.17).

El grupo hemo, [DE]-[IV]-V-[SAW]-L-L-[VSAG]-[SA]-H-[ST]-[IV], se encuentra perfectamente conservado en todos los péptidos de *P.atropurpurascens*.

El sitio activo consenso está integrado por [SGATV]-H-x2-[LIVMA]-R-[LIVMA]-x-[FW]-H-D-[SAC], dentro del cual la secuencia Arg⁷⁸-x3-His⁸² ha sido confirmada por cristalografía de MnP1 de *P. chrysosporium*, así como los residuos adicionales Asn¹¹⁹, His²¹⁶, Phe²³³ y Asp²⁸⁹. Este motivo está perfectamente conservado en todos los péptidos (R-[LA]-x-F-H-D-A, Asn¹¹⁹, His²¹⁶, Phe²³³), con excepción de los primeros cinco residuos amino terminales ([SGATV]-H-x2-[LIVMA]) y la Asp²⁸⁹ que no pueden verificarse por estar fuera de la zona clonada.

El sitio de unión al Mn^{2+} , contiene Glu⁷¹-x3-Glu⁷⁵, Arg²²⁰-x-Asp²²². La secuencia clonada no abarca los residuos Glu⁷¹-x3-Glu⁷⁵. El motivo Arg²²⁰-x-Asp²²² está conservado en la mayoría de las proteínas analizadas incluyendo seis péptidos de *P.atropurpurascens*. El péptido PatrD junto con las proteínas Post, Tver1, Tver4, Abis, Ppul, Prad95 y Led09 presentan el motivo es Ala²²⁰-x-Asp²²².

Las peroxidasas presentan cuatro puentes disulfuro característicos: Cys³⁷-Cys⁵⁰, Cys⁶⁹-Cys¹⁵⁹, Cys⁴⁹-Cys³³⁶, Cys³³⁰-Cys³⁶⁸ y las proteínas MnP presentan uno adicional Cys³⁹⁰-Cys³⁹⁷, no está presente

en las LiP. La región clonada contiene únicamente el residuo Cys¹⁵⁹ presente en todas las proteínas analizadas incluyendo las correspondientes a *P. atropurpurascens*.

El motivo de unión al Ca²⁺ (Asp²⁹⁴, Trp³⁰¹) está fuera de zona disponible.

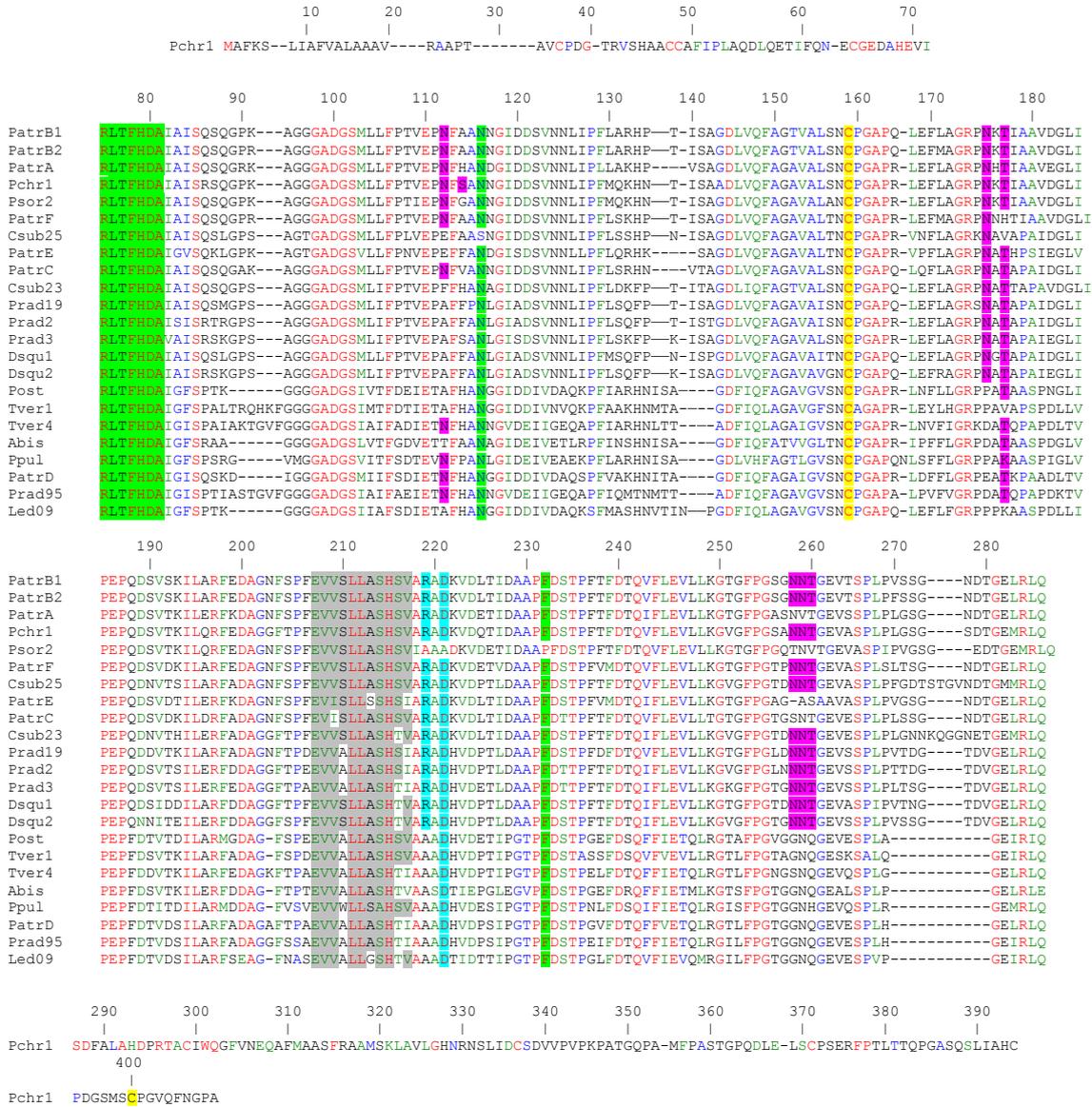


Figura 3.17. Motivos conservados en proteínas MnP y relacionados con la estructura y función.

Alineamiento global de 25 secuencias MnP de diversos Basidiomycetes y péptidos deducidos de *P. atropurpurascens*. Las regiones amino terminal (1-78) y Carboxi-terminal (288-406) están representadas únicamente por Pchr1 (MnP1 de *P. chrysosporium*). La región central (79-287) incluye las proteínas con variaciones en los residuos de interés, se eliminaron las secuencias Led79, Led82, Psor1, Psor3, Criv, Pchr2, Pchr3, Pchr5 y CsubA por presentar los mismos aminoácidos en estudio que la correspondiente a Pchr1. Numeración correspondiente al alineamiento.

sitio de unión al Mn²⁺ puentes disulfuro sitio activo sitio de unión al Ca²⁺ sitios de glicosidación grupo hemo

Finalmente los sitios de glicosidación, tienen el motivo Asn- x-Ser/Thr; en la secuencia de MnP1 de *P. chrysosporium* se encuentran en las posiciones Asn⁷⁶, Asn¹³¹ y Asn²¹⁷. Se observa que el motivo Asn⁷⁶-x-Ser⁷⁸, únicamente está presente en las proteínas de *P. chrysosporium*; los dos restantes (Asn¹⁷⁴-

x-Thr¹⁷⁶ y Asn²⁶⁰-x-Thr²⁶²) están presentes en la mayoría de las proteínas incluyendo seis péptidos de *P. atropurpurascens*, pero estos motivos se pierden en el péptido PatrD y en las proteínas Post, Tver1, Tver4, Abis, Ppul, Prad95 y Led09.

Teniendo en cuenta que este análisis corresponde a las proteínas parciales, se puede concluir que en principio, los péptidos PatrA, PatrB1, PatrB2, PatrC, PatrE y PatrF tienen estructura correspondiente a proteínas MnP típicas ya que además de la alta similaridad, tienen todos los residuos relevantes para su función absolutamente conservados; incluye parte del sitio activo y de unión a Mn, la única Cys de los puentes disulfuros que está dentro de secuencia clonada y dos motivos de glicosidación. En cambio, PatrD forma un grupo con las proteínas Post, Tver1, Tver4, Abis, Ppul, Prad95 y Led09, que si bien comparte con las anteriores el sitio activo y la Cys¹⁵⁹, se diferencia en que no presenta motivos de glicosidación y en que en el sitio de unión Mn el residuo Arg²²⁰ está sustituido por una alanina. Todas las proteínas de este último grupo, que contiene los residuos característicos del sitio activo pero sustituyen Arg²²⁰ por Ala se conocen como MnPs no típicas (Ruiz-Dueñas *et al*, 2009).

Se concluye que este organismo cuenta con por lo menos 7 posibles proteínas MnP, dos de ellas prácticamente idénticas y una pertenecería al grupo de las no típicas.

3.1.2.2 Diseño de oligonucleótidos para cuantificación de genes *mnp*.

Las diferencias encontradas entre las secuencias codificantes de los genes *mnpA*, *mnpB*, *mnpD* y *mnpF*, permitió diseñar un par de oligonucleótidos específico para cada una. Los oligonucleótidos B amplifican ambos genes *mnpB1* y *mnpB2* ya que las diferencias entre ambos no son suficientes para diseñar oligonucleótidos específicos para uno y otro. Por las mismas razones, los oligonucleótidos A abarcan los genes *mnpA*, *mnpC* y *mnpE*. Al igual que para *P. chrysosporium* los oligonucleótidos fueron diseñados manualmente, buscando evitar la amplificación cruzada entre los grupos antes descritos y en el caso del grupo *mnpACE* buscando además que las diferencias no marquen un sesgo en la amplificación (figura 3.18).

a)

```

1   TCCGTCTCACCTTCCACGATGCCATCGCCATATCCCAAAGTCAGGGTCGCAAAGCgtatgttgctttcccttttttacagtggtgcacggaaactgatct
   R L T F H D A I A I S Q S Q G R K

101  cttctctaagGGGCGGAGGCGCTGATGGCTCGATGCTGCTATTCCCCACCGTCGAGCCTAACTTCCACGCAAACGCGGCATCGACGACTCGGTGAATA
   G G G A D G V S M L L F P T V E P N F H A N D G I D D S V N

201  ACCTCATCCCCCTCCTCGCTAAGCATCCTGTGAGCGCCGGCGATCTCGTCCAGTTCGCCGGCGCAGTCGCACTCAGCAACTGCCCGGTGCCCTCGCCT
   N L I P L L A K H P V S A G D L V Q F A G A V A L S N C P G A P R

301  CGAGTTCTGGCGGGTCGGCCAAATCACACTATTGCGGGCGTCAAGGACTCATCCCAGAGCCACAAGACAGCGTCAAAAGATCCTTGAGCGGTTCAAG
   E F L A G R P N H T I A A V E G L I P E P Q D S V T K I L E R F K

401  GACGCCGCAACTTCTCGCCCTTCGAGGTCGTCTCCCTCCTTGCGTGCACAGCGTCGCCCGCGCAGACAAGGTGGACGAGACGATCGACGCGGCTCCTT
   D A G N F S P F E V V S L L A S H S V A R A D K V D E T I D A A P

501  TCGATTCGACACCATTACGTTTCGATACCCAGATCTTCTGGAGGTGCTGCTGAAAGGAACCGGTTCCCCGGCGCGTCAACGTTACGGGGAAAGTGTC
   F D S T P F T F D T Q I F L E V L L K G T G F P G A S N V T G E V S

601  GTCTCCTTTGCCACTGGGAAGCGGGAACGACACGGGCGAGCTGCGCCTGCAGTA
   S P L P L G S G N D T G E L R L Q

```

b)

1 TCCGTCTTACTTTCCACGACGCCATCGCCATCTCCCAGAGCCAGGGTCCCAAGGCTGGCGGAGGCGCCGACGGATCCATGCTCCTCTTCCCCACCGTCGA
 R L T F H D A I A I S Q S Q G P k A G G G A D G S M L L F P T V E

101 GCCCAACTTCGCCCAACAACGGTATCGACGACAGCGTCAACAACCTTATTCGGTTCCTCGCTCGTCACCCGACGATTAGCGCCGGTGACCTCGTCCAG
 P N F A A N N G I D D S V N N L I P F L A R H P T I S A G D L V Q

201 TTCGCTGGCACCCTCGCGCTCAGCAACTGCCCGGCGCTCCCCAACTTGTAGTTCTTGGCTGGACGGCCCAACAAGACGATCGCGGAGTTCGATGGGCTGA
 F A G T V A L S N C P G A P Q L E F L A G R P N K T I A A V D G L

301 TCCCGGAGCCGACGACAGCGTTCGAAGATCCTCGCGCGTTTCGAGGATGCCGGCAACTTCTCGCGTTTGGAGTCTCTCTCTCTCGCCTCTCATTC
 I P E P Q D S V S K I L A R F E D A G N F S P F E V V S L L A S H S
 mnp B12 f ← → mnp B12 r

401 GGTGCTCGCGCCGACAAGGTTGACTTGACCATCGACGCTGCTCCCTTCGACTCGgtcagtacttctggtctgtaatccggcagaaaaacagcagctgac
 V A R A D K V D L T I D A A P F D S

501 tttgcttctctcttagACGCCGTTACCTTCGACACCCAGGTTCTCTCGAGGTGCTCCTCAAGGGCACCGGCTTCCCCGGCTCGGGCAACAACACCGGCGA
 T P F T F D T Q V F L E V L L K G T G F P G S G N N T G E

601 GGTACCTCCCCTCTCCCCGTCAGCAGCGGCAACGACACCGGCGAGCTGCGCCTGCAGTA
 V T S P L P V S S G N D T G E L R L Q

c)

1 TCCGTCTCACCTTCCACGATGCCATCGCCATCTCCCAGAGCCAGGGCCCGGCGGAGGCGCTGACGGATCCATGCTCCTCTTCCCCACCGTCGA
 R L T F H D A I A I S Q S Q G P R A G G G A D G S M L L F P T V E

101 GCCCAACTTTTCGCCCAACAACGGTATCGACGACAGCGTCAACAACCTTATTCGGTTCCTCGCTCGTCACCCGACGATCAGCGCCGGTGACCTGGTCCAG
 P N F A A N N G I D D S V N N L I P F L A R H P T I S A G D L V Q

201 TTCGCTGGCACCCTCGCGCTTAGCAACTGCCCGGCGCTCCCCAACTTGTAGTTTCATGGCGGACGACCAACAAGACGATCGCGGCTGTGACGGTCTGA
 F A G T V A L S N C P G A P Q L E F M A G R P N K T I A A V D G L

301 TCCAGAGCCGACGACAGCGTTCGAAGATCCTCGCGCGTTTCGAGGACCGGCAACTTCTCGCGTTTCGAAGTCTCTCTCTCTCTCGCCTCTCATTC
 I P E P Q D S V S K I L A R F E D A G N F S P F E V V S L L A S H S
 mnp B12 f ← → mnp B12 r

401 GGTGCTCGCGCCGACAAGGTTGACTTGACCATCGACGCTGCTCCCTTCGACTCGgtgagcgcacatctgtgctttgatcaaaaagacaatactcattgct
 V A R A D K V D L T I D A A P F D S

501 cctcgcttcaagACGCCGTTACCTTCGACACTCAGGTGTTCTCTCGAGGTCTCCTCAAGGGCACCGGCTTCCCCGGCTCGGGCAACAACACCGGCGAGG
 T P F T F D T Q V F L E V L L K G T G F P G S G N N T G E

601 TCACCTCCCCTCTCCCCGTCAGCAGCGGCAACGACACCGGCGAGCTGCGCCTGCAGTA
 V T S P L P V S S G N D T G E L R L Q

d)

1 TCCGTCTTACTTTCCACGACGCCATTGCTATCAGCCAAAGCCAAAGGTGCCAAGGCGtaagtgatatttttaacgcccgtacatgcccattgtctgacaca
 R L T F H D A I A I S Q S Q G A K A

101 cccaaagAGTGGCGGCGGAGCCGACGGTTCGATGCTCTTGTTCGCCACAGTTGAGCCCAACTTCGTGGCCAACAACGGTATCGACGACAGCGTGAACAAC
 S G G G A D G S M L L F P T V E P N F V A N N G I D D S V N N

201 TGATCCCCTTCTCTCGAGGCACAACGTCACCGCAGGCGATCTTGTCCAGTTCGCGCGGCGAGTCCGCTCAGCAACCGTCCGGGTGACCCACAGCTTCA
 L I P F L S R H N V T A G D L V Q F A G A V A L S N R P G A P Q L Q

301 GTTCTTGGCGGCGCCCAATGCCACCGCTCCCGCATTGATGGCTCATCCCGAGCCTCAGGACAGCGTCGACAAGATCCTCGACCGTTTCGCGGAT
 F L A G R P N A T A P A I D G L I P E P Q D S V D K I L D R F A D

401 GCCGGCAACTTCTCGCCTTTCGAGGTTATCTCGCTCCIGGCCCTCGCACAGCGTGTCTCGTGGGACAAGGTCGACCTGACCATGACGCCGCCCCCTCG
 A G N F S P F E V I S L L A S H S V A R A D K V D L T I D A A P F
 mnp C f ← → mnp C r

501 ACACGtaagtcggtcaaacatatactacacatgactgactcacaatttatctctctctctgtagACACCCTTACCTTCGACACCCAGGTTCTCTCGA
 D T T P F T F D T Q V F L E

601 GGTGCTGCTCACCGTACCGGTTTCCCAGAAACCGGACGACACCGGTTGAGGTCGAGTACCCCTGCCGCTCTCCAGCGGCAACGACACCGGCGAGCTG
 V L L T G T G F P G T G S N T G E V E S P L P L S S G N D T G E L

701 CGCCTCCAGTA
 R L Q

e)

1 TCCGTCTCACCTTCCACGATGCCATCGGTATCTCCAGTCTAAGGAgtaagacttcattacggtcaatagcttgatgcttatecagattgtcaagtagT
 R L T F H D A I G I S Q S K D

101 ATTGGCGGTGGTGGCAGGGTCTATGATTATCTTTTCAGATATCGAGACTAACTTCCATGCGAAGCGgtacgtcggtctatattggtggttattgatttg
 G G G A D G S M I I F S D I E T N F H A N G

201 actgatcttctctgtagGTGGTATTGACGACATCGTTCGACGCCAGTTCGCCCTTCGTGCCAAGCACAACATCACGGCCGGCGACTTCATACAATTTCGAG
 G I D D I V D A Q S P F V A K H N I T A G D F I Q F A

301 GCGCTATTGGCTCTCCAACCTGCCCGGCGCTCCGCGCTCGACTTTTTTCCTTGGTTCGCGGAGGCCACCAAGCCCGCGCGATCTGACCGTCCCGGA
 mnp D_f ← →

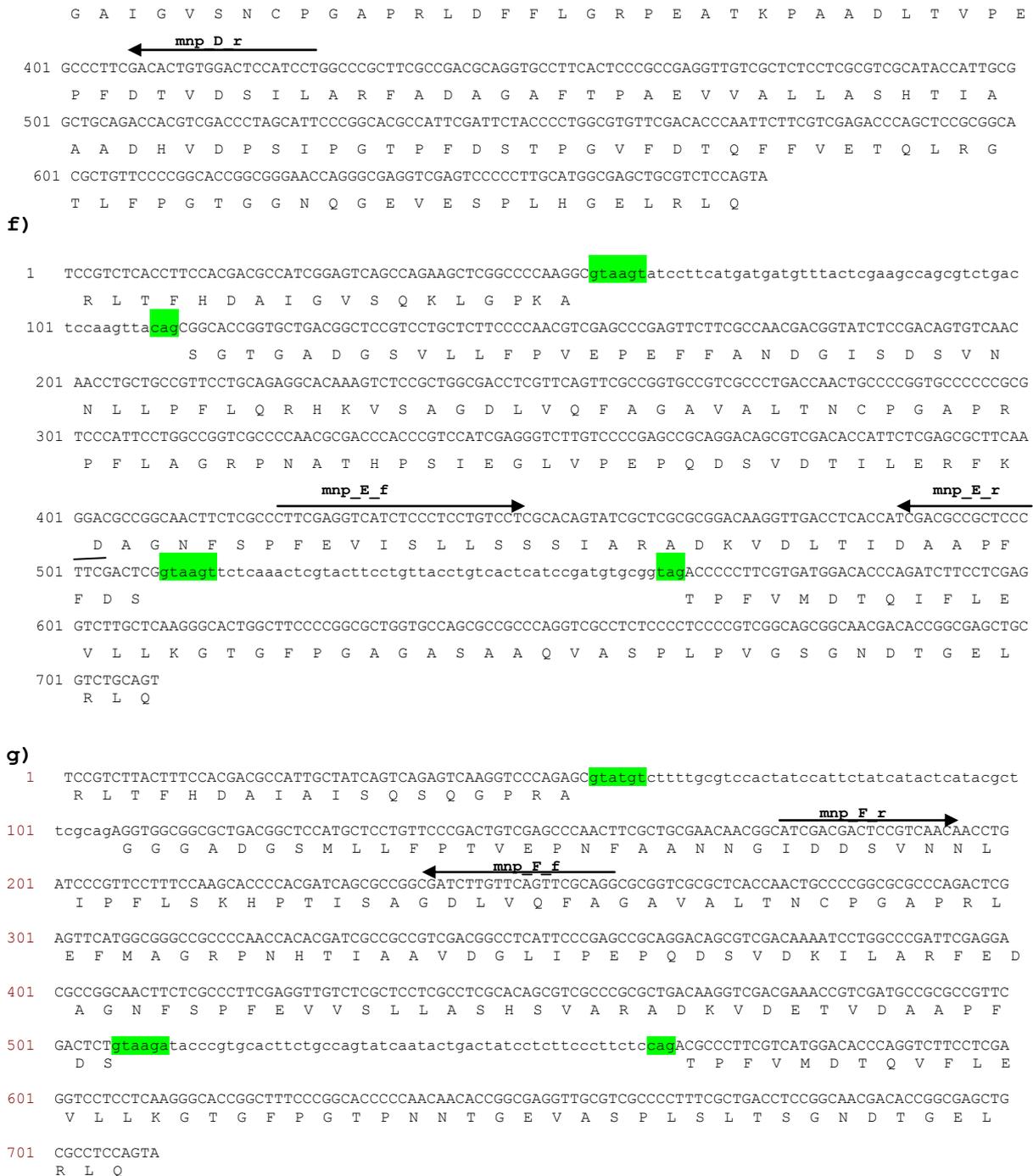


Figura 3. 18: Estructura de los fragmentos secuenciados de los genes *mnp*: a) *mnpA*, b) *mnpB1*, c) *mnpB2*, d) *mnpC*, e) *mnpD*, f) *mnpE*, g) *mnpF*. El codón de iniciación y terminación y los pie de intrón se indican en sombreado. Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificación se indican con flechas.

3.1.2.3 Clonado del gen *gpd* y diseño de oligonucleótidos para cuantificación.

El gen *gpd* se amplificó a partir de ADN genómico por PCR en gradiente de temperatura de *annealing* (61 a 69 °C). Se utilizaron oligonucleótidos degenerados diseñados por Cohen y colaboradores (2004) en base a las secuencias de los genes de *P. chrysosporium* (GeneBank accession nº M81754), *Schizophyllum commune* (accession nº M81724), *Lentinus edodes* (accession nº AB013136) y *Agaricus*

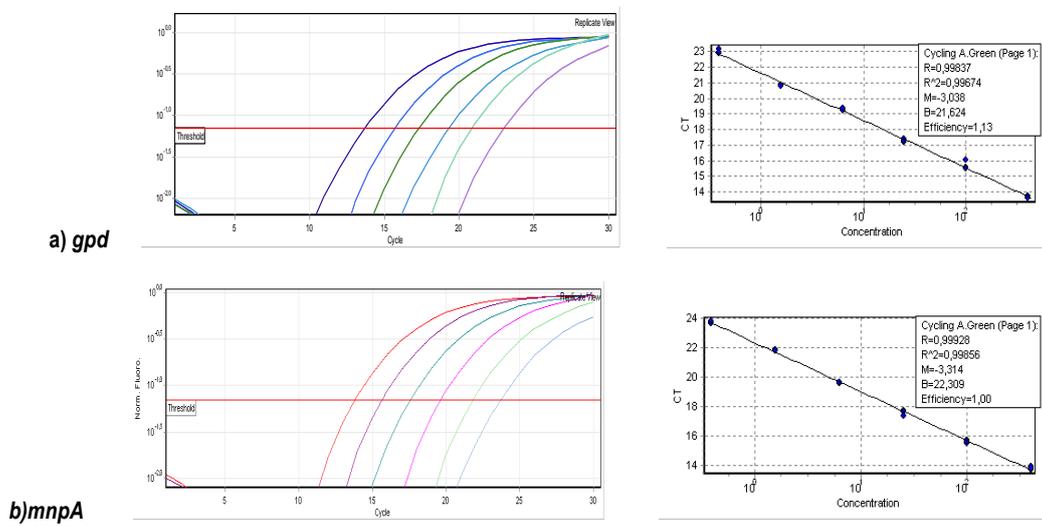
bisporus (accession nº M81728). Por tratarse de un gen único se analizaron solamente 4 clones a partir de los cuales se deduce la proteína y se diseñaron los oligonucleótidos para los estudios de expresión (figura 3.19).



Figura 3.19: Estructura del gen *gpd*. El codón de iniciación y terminación y los pie de intrón se indican en sombreado. Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificación se indican con flechas.

3.1.2.4 Validación de los oligonucleótidos y determinación de la eficiencia de amplificación.

Al igual que los oligonucleótidos de *P.chrysosporium* para cada par de oligonucleótidos, se verificó su especificidad por secuenciación del amplicón correspondiente y se determinó la eficiencia de amplificación, siguiendo el mismo procedimiento (figura 3.20). Los valores de eficiencia obtenidos son $E_{mnpA} = 1,00 \pm 0,01$, $E_{mnpB} = 1,07 \pm 0,01$, $E_{mnpD} = 1,05 \pm 0,01$, $E_{mnpF} = 1,06 \pm 0,01$ Y $E_{gpd} = 1,13 \pm 0,05$ con coeficientes de determinación mayores 0,99, determinados a un valor umbral de 0.02.



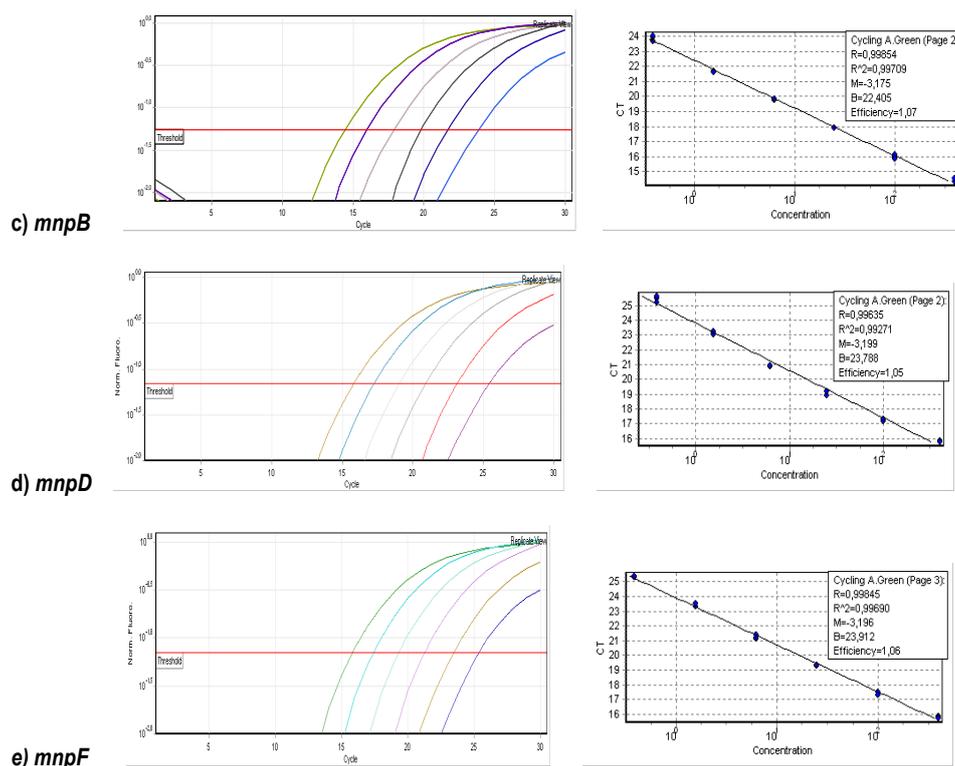


Figura 3.20: Determinación de las eficiencias de amplificación de *mnpA*, *mnpB12*, *mnpD*, *mnpF* y *gpd* de *P. atropurpurascens*. Curvas de amplificación por PCR en tiempo real, de diluciones al cuarto del ADNc, junto a las curvas de correlación correspondientes que permiten determinar la eficiencia de amplificación de cada gen.

3.2 Identificación de condiciones no represoras de la expresión de los genes *mnp*s.

3.2.1 *P. chrysosporium*

Los metales pueden inhibir o inducir la expresión de los genes *mnp*s, por lo tanto la visualización de ambos efectos por PCR cuantitativa depende del nivel de expresión de los genes *mnp*s en el cultivo control sin metal. Al mismo tiempo las condiciones de cultivo influyen en la fisiología fúngica, afectando la expresión de los genes *mnp* que puede ser inducida o inhibida. En el caso de *P. chrysosporium* la variación de la concentración de nitrógeno en el medio, induce su sistema ligninolítico, el cual a su vez es afectado por la disponibilidad de carbono. La temperatura de cultivo y la agitación son parámetros que también deben tenerse en cuenta. (Singh & Chen, 2008; Wang *et al.*, 2008). En consecuencia se comparó la expresión de los genes *mnp* en distintas condiciones de cultivo, en las que los parámetros considerados fueron la composición del medio, la temperatura y si el cultivo estacionario o con agitación, la tabla 3.15 resume las condiciones ensayadas. En Materiales y Métodos, se encuentra la composición de los medios empleados.

Para la condición de cultivo elegida se determinó la cinética de expresión y se estudió la influencia de los metales en dicha expresión génica.

Referencia	Condiciones de cultivo
RB28A	Medio rico , 28°C, agitado
CLB28A	RB c/ deficit C , 28°C, agitado
NLB28A	RB c/ deficit N, 28°C, agitado
M28A	Agua malta, 28°C, agitado
MP28A	Agua malta-peptona, 28°C, agitado
MP-Mn28A	Agua malta-peptona_Mn, 28°C, agitado
RB28	Medio rico , 28°C, estacionario
CLB28	RB c/ deficit C , 28°C, estacionario
NLB28	RB c/ deficit N, 28°C, estacionario
MP28	Agua malta-peptona, 28°C, estacionario
MP-Mn28	Agua malta-peptona_Mn, 28°C, estacionario
RB37A	Medio rico , 37°C, agitado
CLB37A	RB c/ deficit C , 37°C, agitado
NLB37A	RB c/ deficit N, 37°C, agitado
RB37	Medio rico , 37°C, estacionario
CLB37	RB c/ deficit C , 37°C, estacionario
NLB37	RB c/ deficit N, 37°C, estacionario

Tabla 3.4: Condiciones de cultivo ensayadas.

Los medios fueron elegidos de referencias bibliográficas que estudian la expresión de genes de enzimas ligninolíticas y de ensayos previos de nuestro laboratorio. Se comparan medios ricos como extracto de malta (M), extracto de malta con peptona (MP), MP suplementado con Mn²⁺ (MP-Mn) (Gill & Arora, 2003; Kamitsuji *et al.*, 2004; ensayos previos no publicados) y el denominado medio RB (10 g/l glucosa, 64 g/l de tartarato de amonio). Junto a estos se compara con dos “medios ligninolíticos”: uno con contenido de C limitado (CLB) y otro con N limitado (NLB) (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009). Se cultivó a dos temperaturas: 28°C y 37°C, en cultivos estacionarios y a 150 rpm.

Luego de 7 días de cultivo, se realizó la extracción de ARN total, la síntesis de ADNc y la amplificación de los genes *mnp* y *gpd* por PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos se analizaron por el método de Pfaffl (Materiales y Métodos) en el cual los valores de cada ensayo se normalizan con el valor correspondiente para el gen constitutivo *gpd* y se emplea el cultivo en CLB a 37°C estacionario como condición de referencia (figura 3.21).

Los cultivos en RB, CLB y NLB a 28°C estacionarios no ofrecen las condiciones adecuadas dado que no se observa crecimiento al cabo de los 8 días de incubación. En las condiciones ensayadas, la expresión varía de un gen a otro no habiendo un patrón común. Este comportamiento podría asegurar al organismo la producción de manganeso-peroxidasas en un amplio rango de condiciones ambientales. Sin embargo en términos generales puede observarse que:

i) la limitación de la fuente de carbono (CLB) es el más claro inductor de la expresión, siendo la acumulación de los tres genes netamente superior en cultivos estacionarios (CLB 37°C) que en cualquiera de las demás condiciones ensayadas; ii) salvo el MP-Mn, los medios ricos (RB y M) reprimen la expresión de *mnp1* y *mnp3* a 28°C con agitación; iii) la limitación de fuente de nitrógeno no parece ser un factor tan importante.

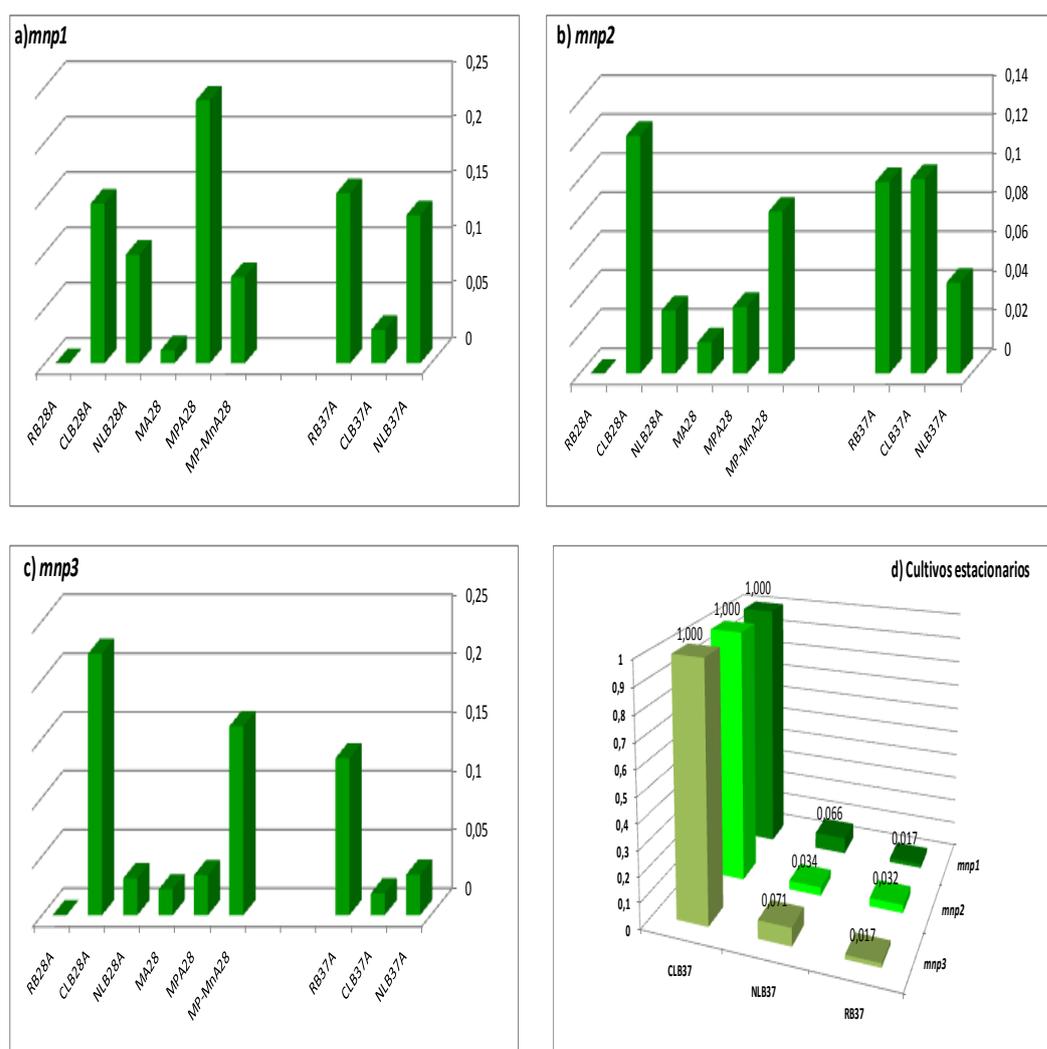


Figura 3.21: Expresión relativa de los genes *mnp* de *P. chrysosporium* en diferentes condiciones de cultivo.

a) *mnp1* de; b) *mnp2*; c) *mnp3* en cultivos agitados a 150 rpm; d) los tres genes *mnp* en cultivos estacionarios.

Considerando los resultados anteriores, se estudia la cinética de expresión de los genes *mnp* en un cultivo estacionario en el medio CLB a 37°C, con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de cultivo, definido como el tiempo necesario para que la acumulación de ARNm alcance un máximo. Nuevamente el análisis de los resultados obtenidos en la amplificación por qPCR se realiza por método de Pfaffl, tomando como condición de referencia el día 7 de cultivo. La figura 3.22 muestra la cinética de expresión para cada gen.

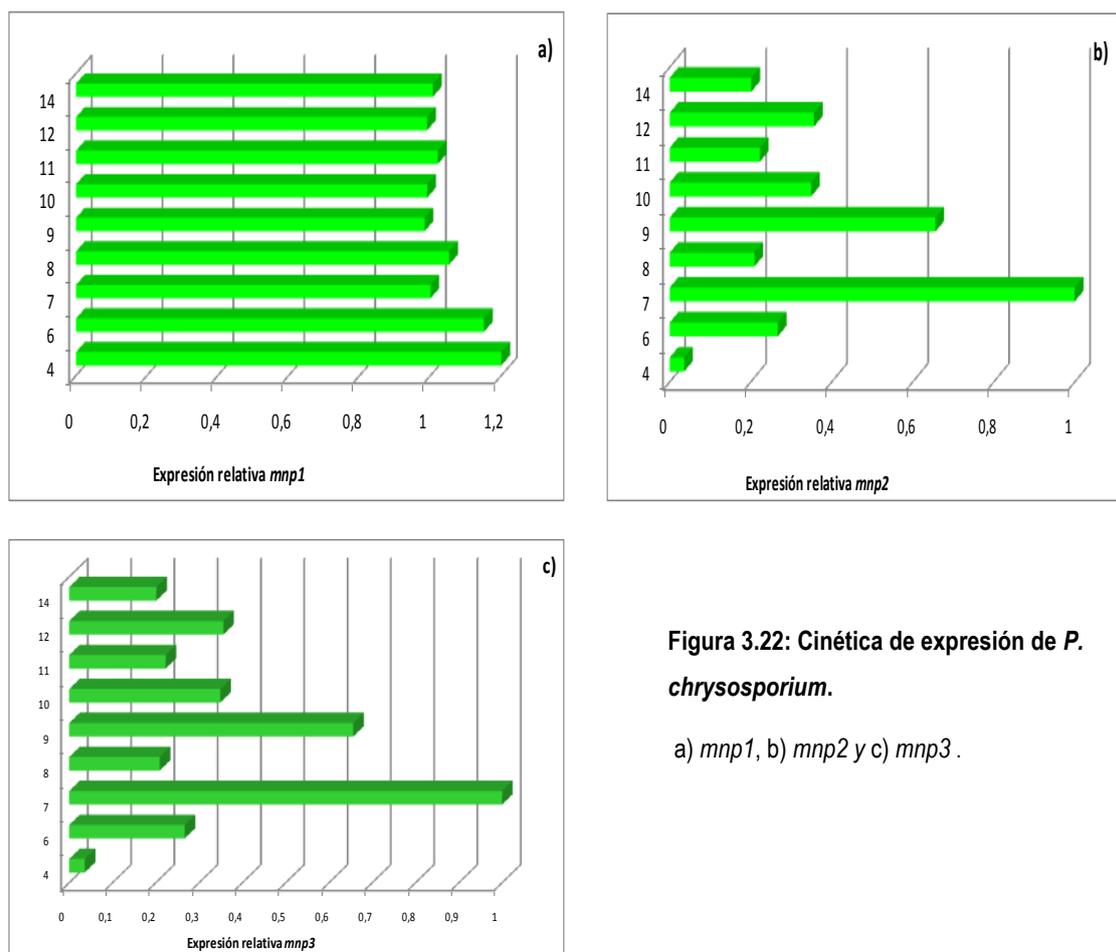


Figura 3.22: Cinética de expresión de *P. chrysosporium*.

a) *mnp1*, b) *mnp2* y c) *mnp3*.

Al observar los gráficos de la figura, se ve que el nivel de expresión relativa presentado por los 3 genes es muy similar siendo ligeramente mayor el correspondiente a *mnp1*. Este presenta su máximo de expresión en el día 4 de cultivo, más temprano que las otras dos isoenzimas que lo hacen en el día 7 para *mnp2* y *mnp3*, lo que indica que las diferentes isoenzimas fueron expresadas de acuerdo a las necesidades del hongo y la disponibilidad de nutrientes en el medio. Se selecciona el día 7 de cultivo, para realizar el estudio del efecto de los metales sobre la expresión génica. Esto se debe a que si se eligiera el día 4 donde *mnp1*, presenta mayor nivel de expresión no podría estudiarse el efecto de los metales sobre las otras dos isoenzimas que tienen muy bajo nivel de expresión. Al mismo tiempo el día 7 de cultivo la diferencia de expresión del gen *mnp1* es solo 20% menor a la correspondiente al día 4 de cultivo.

3.2.2 *P. atropurpurascens*

Si bien el efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión de las *mnp*s en hongos de la pudrición blanca, varía con la especie analizada se consideran los resultados obtenidos con *P. chrysosporium* para el diseño experimental de esta etapa. En consecuencia el medio rico RB, no se

ensaya, así como tampoco los cultivos agitados, ya que en *P. chrysosporium* se obtuvieron expresiones relativas menores a las obtenidas en los cultivos estacionarios.

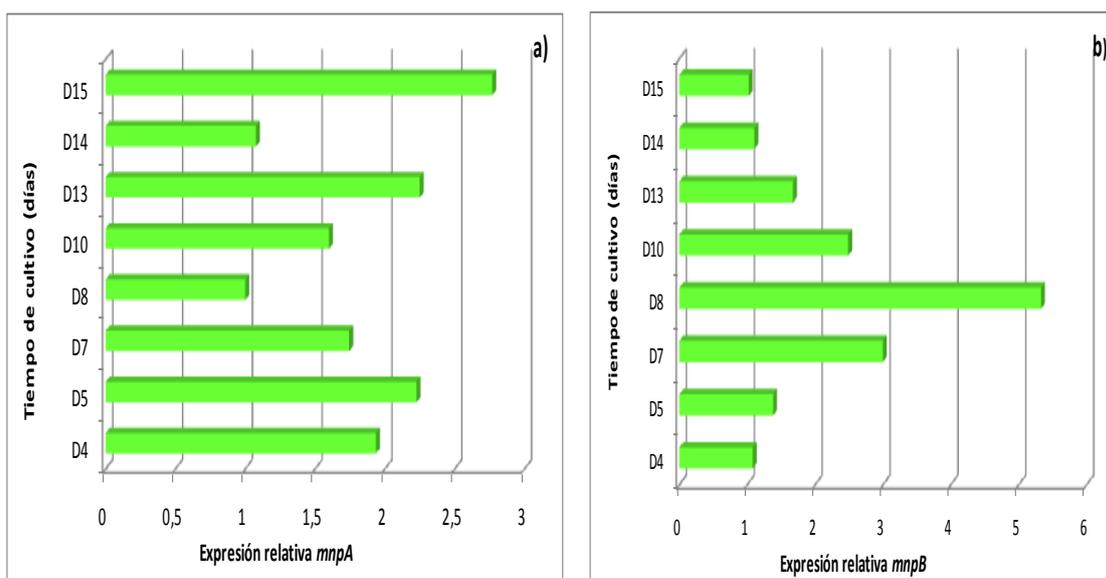
En la tabla 3.16 se encuentran las condiciones ensayadas.

Referencia	Condiciones de cultivo
CLB 28	RB c/deficit de C, 28°C, estacionario
NLB 28	RB c/deficit de N, 28°C, estacionario
M 28	Agua malta, 28°C, estacionario
MP 28	Agua malta-peptona, 28°C, estacionario
CLB 37	RB c/deficit de C, 37°C, estacionario
NLB 37	RB c/deficit de N, 37°C, estacionario
M 37	Agua malta, 37°C, estacionario
MP 37	Agua malta-peptona, 37°C, estacionario

Tabla 3.5: Condiciones de cultivo ensayadas para *P. atropurpurascens*.

P. atropurpurascens presenta diferente comportamiento en las distintas condiciones. En los medios agua de malta a 37°C y CLB a 28°C no crece en tanto que en CLB a 37°C crece pero no hay expresión de los genes *mnp*s. En los medios NLB y MP crecer muy lentamente, se recupera poco micelio al cabo de 8 días de cultivo a ambas temperaturas, pero tampoco hay expresión génica. Solamente en CLB a 28°C, se pudieron cuantificar los genes *mnp*s.

Como en *P. chrysosporium* se estudia la cinética de expresión de los genes *mnp* en un cultivo estacionario en el medio agua de malta a 28°C, con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de cultivo. El análisis de los resultados obtenidos en la amplificación por qPCR se realiza por método de Pfaffl, nuevamente normalizado por *gpd* y se elige el día 8 de cultivo como condición de referencia. La figura 3.23 muestra la cinética de expresión para cada gen.



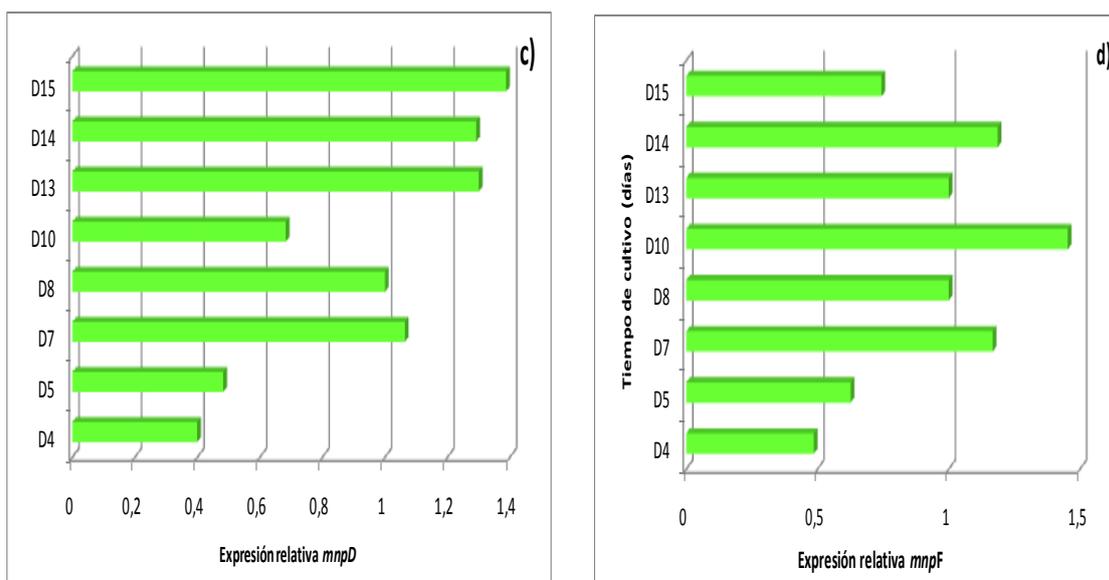


Figura 3.23: Cinética de expresión de los genes *mnp* de *Patropurpurascens*. *mnpA* incluye a C y E

Se puede observar que son genes de expresión ligeramente más alta que los correspondientes de *P.chrysosporium*; *mnpB* es el gen de mayor expresión de los cuatro y tiene su valor pico el día 8 de cultivo. Este es el día de cultivo elegido para el estudio de expresión.

3.3 Efecto del Zn²⁺ y el Mn²⁺ en la expresión de los genes *mnp*s

3.3.1 *P. chrysosporium*

El Zn²⁺ y el Mn²⁺ son elementos esenciales, involucrados en numerosos procesos del metabolismo primario y secundario; analizados sus efectos inhibitorios o inductores sobre el crecimiento y la actividad ligninolítica, se estudia el efecto de estos metales sobre la expresión de los genes de las peroxidasas manganeso dependientes. Se agregan los metales al medio de cultivo inoculado con los basidiomycetes de acuerdo al esquema de la tabla 3.17. Tras 7 días de cultivo, se extrajo el ARN total, se sintetizó el ADNc y se cuantificaron los genes *mnp* y *gpd* por PCR en tiempo real; los resultados se analizaron por el método de Pfaffl tomando el cultivo sin metal como condición de referencia. (Materiales y Métodos). El cultivo control sin metal es tomado como referencia para el análisis, en consecuencia presenta un valor 1 de expresión relativa en las tres cuantificaciones.

Zn (mM)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
Mn (mM)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	12
Zn-Mn (mM)	0			1 - 0,5		2 - 1	4 - 2	8 - 4	12 - 6

Tabla 3.6: Concentraciones finales en los cultivos en CLB de *P. chrysosporium* (mM de metal).

Una concentración de 14 mM en Zn inhibe totalmente el crecimiento micelial, al igual que en la mezcla de Zn – Mn (2:1); sin embargo a concentraciones mayores a 14 mM en Mn *P.chrysosporium* continúa creciendo. La figura 3.24 muestra la expresión relativa de cada gen *mnp* a las distintas concentraciones de Zn y Mn ensayadas. Se observa un patrón de expresión diferencial en cada gen *mnp* respecto a los metales; *mnp1* alcanza los mayores niveles de expresión por inducción metálica, a la vez que *mnp3* es menos sensible a la inducción metálica y supera en poco el valor de expresión en el cultivo control. Se pueden distinguir aquellas concentraciones de metal con un claro efecto inductor de la expresión de los genes, fundamentalmente para Mn.

En el gráfico a) que presenta la expresión relativa de *mnp1*, se omiten los valores de expresión en los cultivos con un concentración de 1 mM en Mn (140,11) y 4 mM en Mn (102,9), porque al ser un orden de magnitud mayores a los otros puntos no permite visualizar la variación de la expresión frente a las otras concentraciones metálicas.

El Zn^{2+} inhibe la expresión de *mnp1* a todas las concentraciones ensayadas. Menos claro es el efecto sobre la expresión de *mnp2* y *mnp3*, que muestran cantidades de ARNm iguales o menores a *mnp1* para la mayoría de las concentraciones de Zn^{2+} pero sorpresivamente concentraciones de 1 mM y 8 mM inducen la expresión. A pesar de estas diferencias, la concentración máxima de Zn^{2+} ensayada (12 mM) inhibe totalmente la expresión de los tres genes *mnp*.

La presencia de Mn^{2+} en el medio mostró un fuerte efecto inductor de la expresión de *mnp1*, que se puede observar a la máxima concentración ensayada (12 mM en Mn^{2+}). A 1 mM y 4 mM en Mn^{2+} presenta picos de expresión cuyos valores, 140 y 102 respectivamente, superan en un 200% los valores medios de inducción a las otras concentraciones metálicas estudiadas. Frente a *mnp2* y *mnp3*, también es inductor de la expresión génica, pero a niveles mucho menores. En estos casos, la expresión es inhibida a concentraciones de 8 mM y 2 mM en metal en cada gen. El aumento del nivel de transcritos de los genes *mnp* de *P. chrysosporium* con la concentración de Mn^{2+} en el medio de cultivo, ya había sido reportado en la literatura, pero a bajas concentraciones como 180 μM (Brown *et al.*, 1990, 1991), o 160 μM en cultivos estáticos de *C. subvermispota* (Gutierrez *et al.*, 2008). Al mismo tiempo se afirma que el Mn^{2+} no afecta el nivel de transcritos de *mnp3* en medios con contenido de nitrógeno limitado (Gettemy *et al.*, 2004; Hammel & Cullen, 2008).

Respecto al efecto de la mezcla Zn^{2+} - Mn^{2+} se puede decir que la expresión de *mnp1* se incrementa únicamente a baja concentración (0,5 mM Zn^{2+} – 0,25 mM Mn^{2+}) en todos los demás casos la expresión es intermedia a las correspondientes a la de cada metal por separado a la misma concentración. Para *mnp3* claramente es inhibidor para todas las concentraciones, incluso más que cada metal por separado a las concentraciones de la mezcla: por ejemplo la mezcla 2-1 mM presenta menos ARN que la de Zn^{2+} 2 mM y la de Mn^{2+} 1 mM.

En resumen, la expresión de los tres genes responde a diferentes mecanismos:

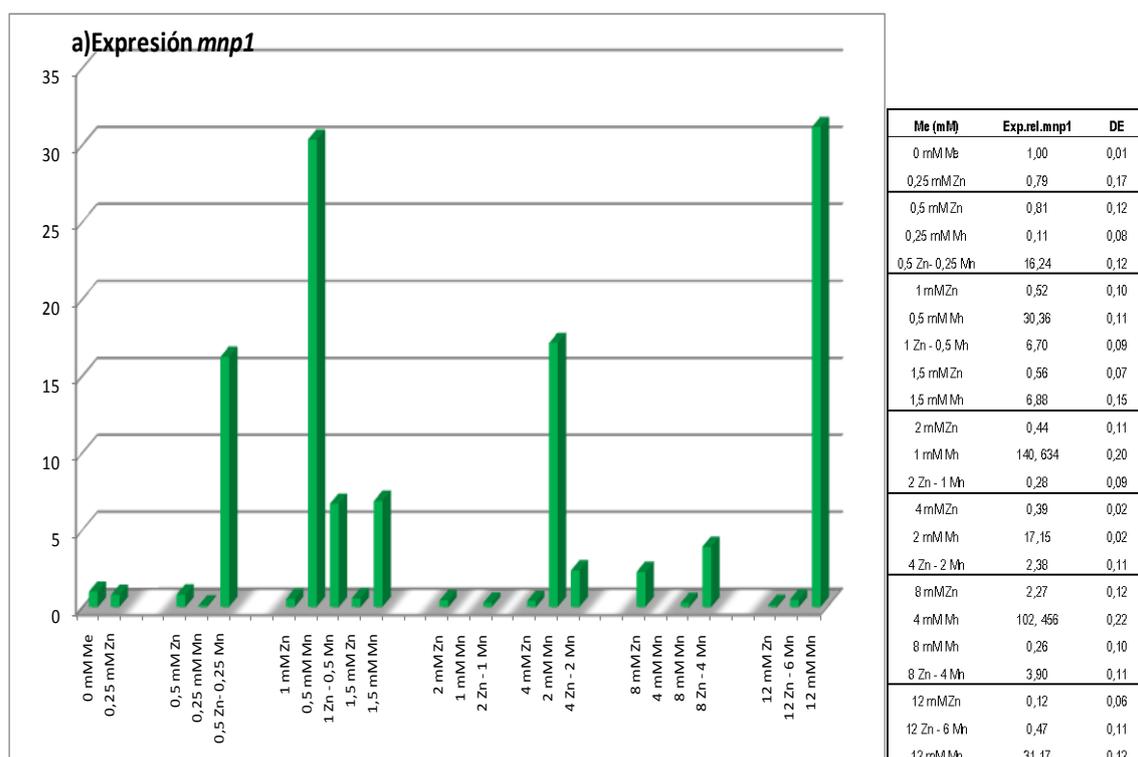
mnp1, en líneas generales el Zn^{2+} tiene un efecto represor, el Mn^{2+} inductor y los mecanismos se contrarrestan en la mezcla.

mnp3, ambos metales por separado no parecen tener un efecto neto pero la mezcla potencia mecanismos de represión.

mnp2, parecen actuar diferentes mecanismos en función de la concentración de cada metal potenciándose la represión en algunos casos y teniendo el efecto opuesto en otros.

La expresión de los genes se regula a través de factores transcripcionales que reconocen secuencias específicas en los promotores que regulan, induciendo o reprimiendo su transcripción (regulación positiva o negativa respectivamente). Estos factores responden directa o indirectamente a algún metabolito (amonio, glucosa, H^+ , etc) o ión metálico. Todos estos factores actúan en los promotores de los genes *mnp* modulando su expresión. La posición de la secuencia reconocida por cada uno de estos factores sobre los promotores determina la ubicación tridimensional del factor unido y la interacción del mismo con el resto de la maquinaria transcripcional.

Hasta la fecha, se ha identificado un solo tipo de secuencia reconocida por los factores que responden a metales (MRE); secuencias de este tipo están presentes en los promotores de los tres genes en estudio. La ubicación de los MRE no es conservada por lo que no es extraño que la respuesta a los metales sea diferente entre un gen y otro. Además, existen evidencias que sugieren la existencia de secuencias diferentes a MRE, que también serían reconocidas por factores de respuesta a metales (Hammel & Cullen, 2008). La coexistencia de más de un sitio de unión al ADN, y más de un tipo de factor podría explicar las diferencias de expresión de un gen dado frente a la presencia de uno u otro metal y a la mezcla.



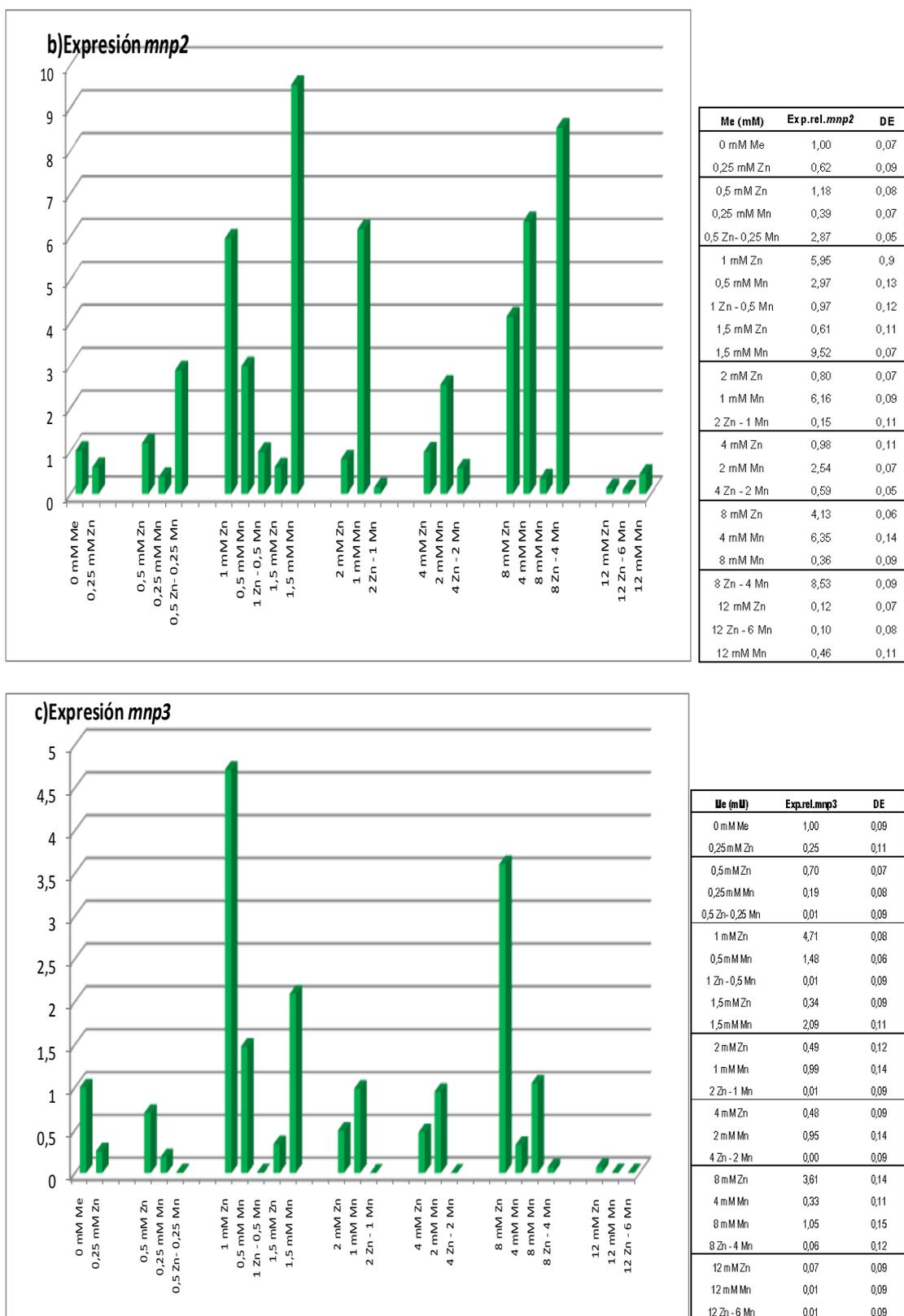


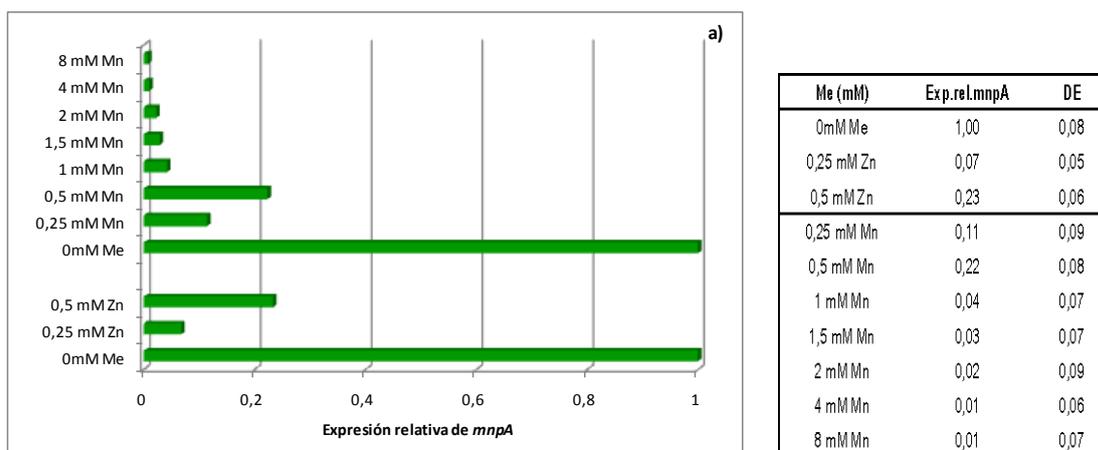
Figura 3.24: Efecto del Zn²⁺, del Mn²⁺ y de Zn²⁺-Mn²⁺ (2:1) sobre la expresión de los genes *mnp*: a) *mnp1*, b) *mnp2* y c) *mnp3*.

3.3.2 *Punctularia atropurpurascens*

Para estudiar el efecto de los metales sobre la expresión de los genes *mnps*, se trabajó en las condiciones de no represión de la expresión génica identificadas (3.2.2): 8 días de cultivo estacionario en agua de malta a 28°C. Allí se adicionó las soluciones de sulfatos de Zn y Mn puras a las concentraciones finales en el medio de presentadas en la tabla 3.17. La cuantificación se hizo tomando el control sin metal como condición de referencia (Materiales y Métodos); los resultados se presentan en la figura 3.25.

Al cabo de 8 días de cultivo en medio líquido, se observa que el Zn inhibe totalmente el crecimiento a todas las concentraciones ensayadas mayores a 1mM en Zn (1mM, 1,5 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM y 12 mM en Zn). Esa inhibición persiste luego de 15 días más de cultivo. Sin embargo el Mn, inhibe totalmente el crecimiento de *P.atropurpurascens*, a la mayor concentración ensayada (12mM en Mn). Por el contrario la mezcla de Zn – Mn inhibe totalmente el crecimiento a todas las concentraciones ensayadas (1mM Zn- 0.5 mM Mn; 2 mM Zn – 1 mM Mn; 4 mM Zn – 2 mM Mn; 8 mM Zn – 4 mM Mn; 12 mM Zn – 6 mM Mn). En medio líquido también se observa la mayor sensibilidad de *P. atropurpurascens* a la presencia de los metales. Se determinó la expresión génica en aquellos cultivos en los que hubo crecimiento.

El Zn²⁺ tiene efecto inhibitor sobre la expresión de los genes de las manganoso peroxidadas de *P. atropurpurascens* a las concentraciones estudiadas (0,25 y 0,5 mM). El Mn es inhibitorio de la expresión del gen *mntA* a todas las concentraciones ensayadas. En *mntB* y *mntF* presenta un efecto inductivo a las menores concentraciones (0,25 y 0,5 mM), para convertirse en inhibitor de la expresión al aumentar la concentración de metal. Por último puede observarse que no existe regulación por Mn sobre los genes *mntD*, este comportamiento diferente coincide con la pertenencia de esta enzima al grupo de las MnPs no típicas (3.1.2.1).



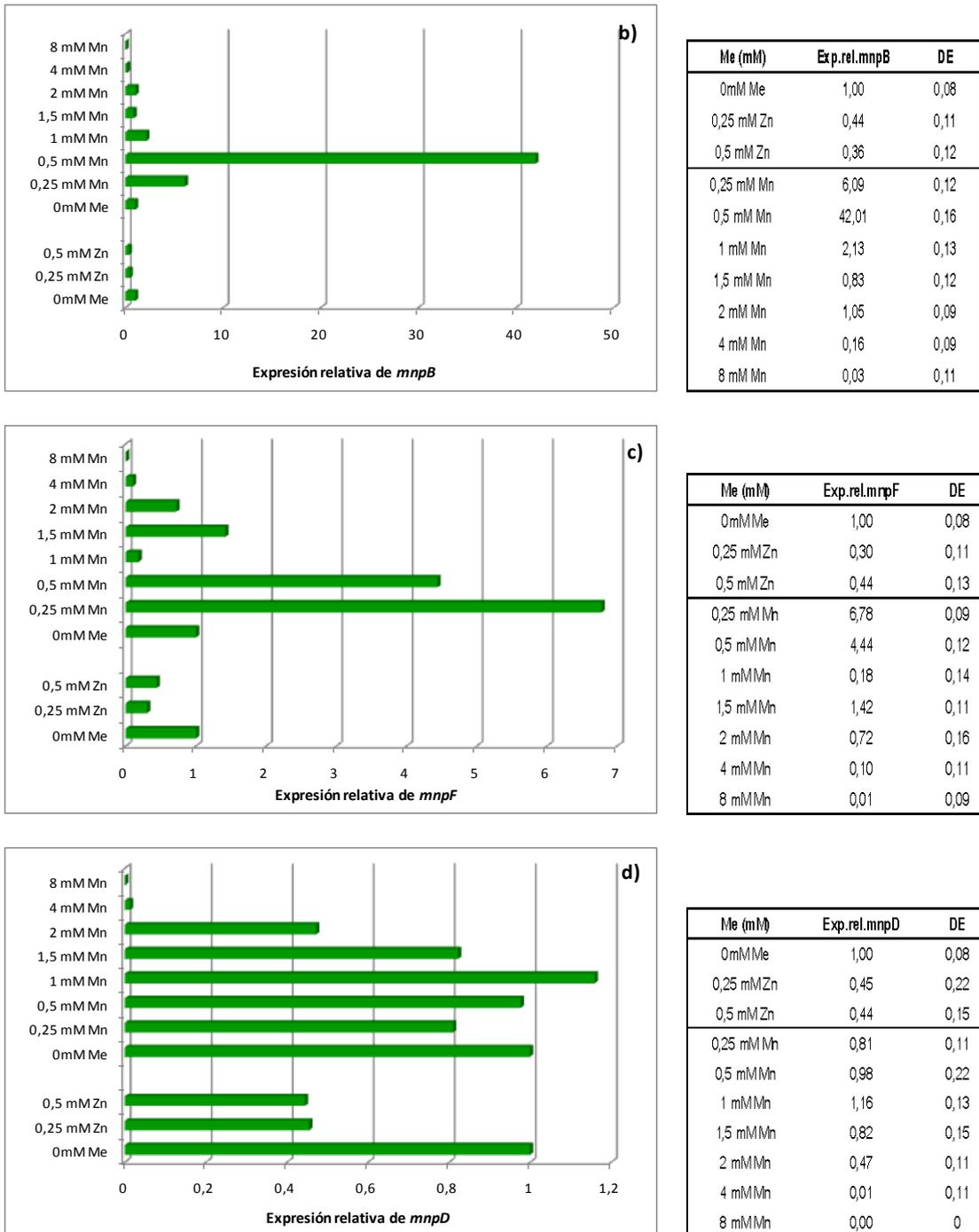


Figura 3.25: Expresión relativa de las *mnp*s de *P. atropurpurascens* en presencia de metales.

3.4 Resumen de los resultados

Patropurpurascens cuenta con por lo menos 7 posibles proteínas MnP, dos de ellas prácticamente idénticas y una pertenecería al grupo de las no típicas. Estas proteínas presentan alta similaridad con MnP típicas de otros basidiomycetes y tienen todos los residuos relevantes para su función enzimática absolutamente conservados. Solo una de ellas tiene una mayor similaridad con las denominadas MnP no típicas; estas enzimas carecen de un residuo que contribuye a la unión del Mn a la enzima.

Para los estudios de expresión se identificaron las condiciones de cultivo (composición del medio, temperatura de cultivo y agitación) no represoras de la expresión de los genes *mnp*s. Para *P.chrysosporium* fueron: medio CLB, en cultivo estacionario a 37°C; el crecimiento es inhibido a 14 mM en Zn y 14 mM en Zn – 7 mM en Mn, en tanto que a una concentración de 12 mM en Mn continúa creciendo. En cambio las condiciones de cultivo de no represión de la expresión de los genes *mnp* de *P.atropurpurascens* son agua de malta en cultivo estacionario a 28° C. El crecimiento es inhibido a 1 mM en Zn, 12 mM en Mn y a todas las concentraciones ensayadas de la mezcla Zn – Mn, lo que nuevamente pone de manifiesto la mayor sensibilidad de este basidiomycete a la presencia de metales.

En los estudios de expresión de los genes *mnp*, se observa que en líneas generales el Zn tiene un efecto inhibitorio de los genes *mnp*, en tanto que el efecto del Mn es especie dependiente. De la mezcla de metales solo se conoce el efecto sobre *P.chrysosporium*.

En particular sobre los genes de *mnp* de *P.chrysosporium*, el Zn²⁺ inhibe la expresión de *mnp1* a todas las concentraciones ensayadas, mientras que en *mnp2* y *mnp3*, las cantidades de ARNm son iguales o menores a *mnp1* para la mayoría de las concentraciones de Zn²⁺, con dos concentraciones de 1 mM y 8 mM inducen la expresión. A pesar de estas diferencias, la concentración máxima de Zn²⁺ ensayada (12 mM) inhibe totalmente la expresión de los tres genes *mnp*. El Mn²⁺ mostró un fuerte efecto inductor de la expresión de *mnp1*, frente a *mnp2* y *mnp3*, también es inductor de la expresión génica, pero a niveles mucho menores. En estos casos, la expresión es inhibida a concentraciones de 8 mM y 2 mM en metal en cada gen. La mezcla Zn²⁺ - Mn²⁺, la expresión es intermedia a las correspondientes a la de cada metal por separado a la misma concentración. Para *mnp3* claramente es inhibitorio para todas las concentraciones.

Visto desde el punto de vista de los genes individuales:

mnp1, el Zn²⁺ tiene un efecto represor, el Mn²⁺ inductor y los mecanismos se contrarrestan en la mezcla.

mnp3, ambos metales por separado no parecen tener un efecto neto pero la mezcla potencia mecanismos de represión.

mnp2, parecen actuar diferentes mecanismos en función de la concentración de cada metal potenciándose la represión en algunos casos y teniendo el efecto opuesto en otros.

En el caso de *Patropurpurascens*, por su mayor sensibilidad a la presencia de los metales, se estudia el efecto del Zn²⁺ a las menores concentraciones ensayadas, donde es inhibitorio. El Mn también

es inhibidor de la expresión de los genes *mnp*, pero para dos de los genes presenta dos concentraciones que son bajas (0,25 y 0,5 mM en Mn) donde induce la expresión a niveles superiores a los hallados en el cultivo control sin metal. Sobre el cuarto gen, no hay regulación por parte del Mn^{2+} .

4 - APLICACIÓN DE LA SOLUCIÓN OBTENIDA DEL RECICLADO DE PILAS COMO CONSERVADOR PARA MADERA

4.1 - INTRODUCCIÓN

El problema de las pilas

Por su composición las pilas y baterías agotadas ocasionan un impacto ambiental negativo. La disposición de las pilas junto a los residuos sólidos urbanos podría crear problemas de contaminación de aguas subterráneas proveniente de la lixiviación de los metales que contienen. Esta situación ha causado justificada preocupación tanto en ámbitos gubernamentales, científicos y técnicos, como en el público en general y sus organizaciones.

El dióxido de manganeso y el zinc son los principales componentes de las pilas comunes y alcalinas secas. A las nuevas generaciones de estas pilas se les redujo el contenido de mercurio, plomo y cadmio, por lo tanto estas baterías en particular no representan un riesgo ambiental severo. En muchos países estas pilas son clasificadas como residuos domésticos. Sin embargo este tipo de disposición en los rellenos sanitarios representa un importante y continuo ingreso de zinc y manganeso al suelo. El reciclado de las baterías usadas es una vía adecuada de mitigar este impacto desde un punto de vista ambiental, si bien existen aspectos prácticos y económicos que restringen esta opción. Esta solución implica recolectar, clasificar y aprovechar los materiales que contienen las pilas y baterías usadas, algunos de ellos materias primas no renovables, evitando paralelamente la posible contaminación que cause su mala disposición. El éxito de dicho planteo depende del desarrollo de tecnologías viables en países como Uruguay y del aprovechamiento por parte de otros sectores industriales de los productos obtenidos en el proceso, evitando el clásico “enterramiento por separado” de los componentes del material tratado.

En nuestro país se producen como residuo unas 2500 toneladas anuales, de las cuales según información proporcionada por la IMM (Intendencia Municipal de Montevideo) se recolectan aproximadamente 250 kg por semana. Menos del 1% del total estaría disponible para reciclar sin realizar campaña de recolección. Sería razonable esperar que con una reactivación de dicha campaña se llegara al 10%, unas 250 toneladas al año. Un estudio indica que el consumo de pilas en Uruguay es de entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ kg de pilas por persona por año lo que equivale en número de unidades a 10 o 15 pilas por persona por año; de ellas el 95% corresponde a pilas comunes y alcalinas. El resto son pilas botón, de litio, recargables de Ni-Cd, etc (comunicación personal IMM). Estas cifras son análogas a las encontradas en los países europeos lo único que varía es la relación de consumo entre alcalinas y comunes, siendo mayor aquí el consumo de pilas comunes y menor el correspondiente a alcalinas y otras pilas.

Procesos de reciclado existentes

A nivel mundial los procesos de reciclado utilizados incluyen dos grandes opciones: los tratamientos por calor (métodos termo o pirometalúrgicos) y los tratamientos por vía húmeda (métodos hidrometalúrgicos). Ambos métodos son comunes a la minería y a la metalurgia (Bernardes *et al*, 2004).

Los procesos de reciclado de baterías que han alcanzado un nivel de desarrollo a escala industrial están basados en los procesos pirometalúrgicos. Estos operan a altas temperaturas; están en general asociados a un estricto control de emisiones atmosféricas por generar dioxinas, compuestos clorados y mercurio. Aquí aparecen dos posibilidades de tratamientos, los procesos diseñados específicamente para las pilas y aquellos procesos metalúrgicos, donde se utilizan las pilas como materia prima. Un ejemplo de esto es la producción de acero, donde los metales contenidos en algunas pilas, son usados como materiales de entrada para ajustar la composición del acero. Estos procesos serían difíciles de implementar en nuestro país, por la escasez de industrias metalúrgicas. En cambio, los procesos hidrometalúrgicos están asociados a etapas de lixiviación en medio alcalino o ácido y a procesos de purificación, ya sea para disolver la fracción metálica, ya sea para recuperar las soluciones metálicas que pueden ser usadas por la industria química. Poseen como principales ventajas frente a los procesos pirometalúrgicos, que son económicos, no producen dioxinas, necesitan poca energía y son de más simple control.

Tanto en Europa (Francia, Inglaterra y España) como en EEUU y Japón se encuentran antecedentes de estudios y plantas de tratamiento que emplean procesos hidrometalúrgicos, pero que no son económicamente viables en nuestro país (Proceeding International Congress for Battery Recycling, 1995 al 2004). Existen numerosos antecedentes de estudios de laboratorio a nivel mundial, destacándose los presentados por Brasil, Argentina e Italia (Bartolozzi *et al*, 1994; Martha de Souza *et al*, 2001; Vatisistas *et al*, 2001; Andrade Tacca *et al.*, 2004). Las soluciones propuestas a nivel de planta, son originadas en los países desarrollados y aplicables, sólo parcialmente, en estos países. Por tanto ha sido de sumo interés desarrollar tecnologías de reciclado viables para países del Sud América.

Proceso hidrometalúrgico diseñado

En la Unidad Académica de Gestión Tecnológica de la Facultad de Química se ha trabajado desde hace varios años en el estudio del reciclado de las pilas comunes y alcalinas. Por ser ambientalmente más seguros y tecnológicamente más adecuados al Uruguay, donde no existen industrias metalúrgicas del Zn o Cd, se ha optado por los métodos hidrometalúrgicos. La finalidad del proceso hidrometalúrgico de tratamiento de las pilas es, básicamente, transformarlas en subproductos que puedan ser reaprovechados en otras actividades o dispuestos sin consecuencia perjudiciales para el medio ambiente.

Se ha desarrollado un proceso versátil (figura 4.1), que permite obtener una solución de Zn y Mn libre de metales pesados a emplear como conservador para madera. La materia orgánica, los fosfatos y sales de NH_4 y K, que podrían ser utilizados como nutrientes por los hongos que descomponen la madera, son eliminados mediante un lavado con agua del sólido molido previamente al lixiviado. Esta etapa no es tan importante cuando se utiliza la solución como micronutriente en la fabricación de

fertilizantes. También pueden variarse las concentraciones de otros metales en la solución como hierro y cobre, en cantidades tales que puedan tener un efecto sinérgico como funguicidas.

La composición promedio de dicha solución de pH 2, en cual los metales están como sulfatos es: Zn 32 g/l, Mn 15 g/l, Cd 0,5 mg/l, Pb 0,63 mg/l, Hg 0,7 mg/l, Cu 34 mg/l, Ni 38 mg/l y Cr 2,0 mg/l.

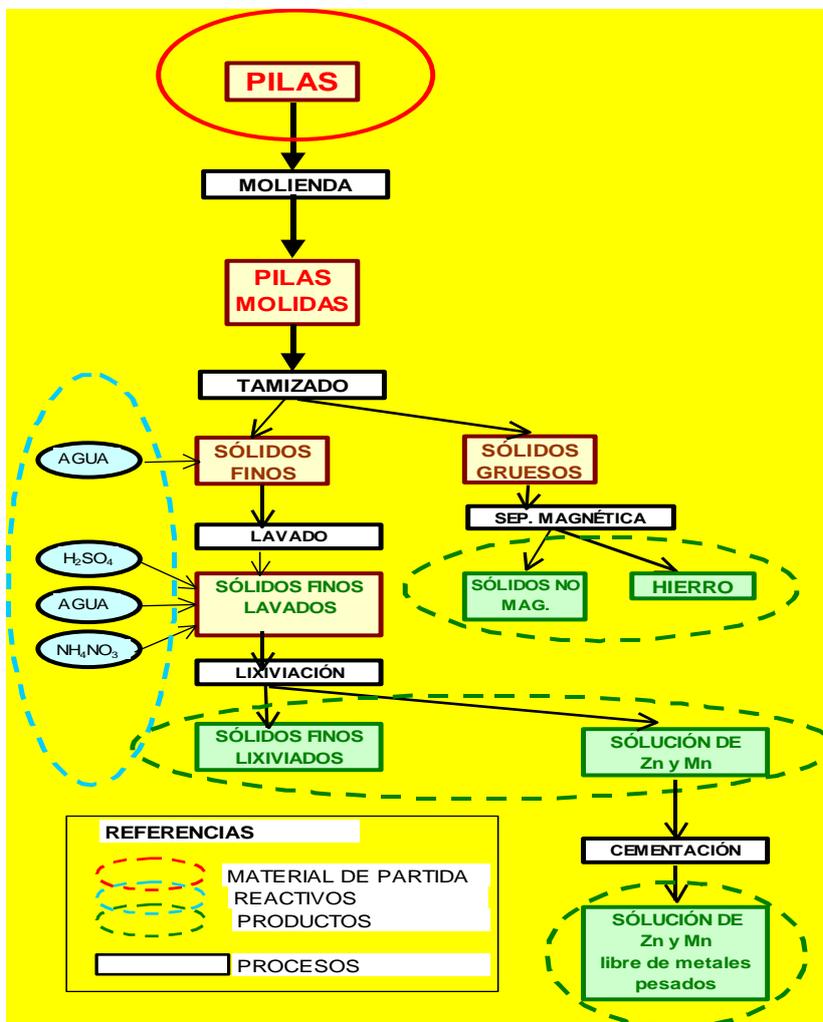


Figura 4.1: Esquema del proceso de reciclado de pilas desarrollado

4.2 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se espera que la influencia de la solución obtenida en el proceso de reciclado de pilas sobre la fisiología de los hongos filamentosos, sea análoga a la producida por la mezcla de los sulfatos puros de Zn y Mn (en relación 2:1) a menos que la matriz en la que se encuentran las sales en dicha solución tenga un efecto antagónico al producido por los metales.

Por lo tanto, se estudia el efecto de la solución sobre los dos parámetros fisiológicos anteriormente estudiados: el crecimiento (en malta y en madera) y el sistema enzimático ligninolítico de las especies fúngicas elegidas. Se aplican las mismas estrategias que al ensayar las sales puras (en esta etapa no se estudia la regulación génica), buscando responder las mismas interrogantes. Se realiza además un ensayo de campo con probetas impregnadas con la solución obtenida en el reciclado.

4.2.1. Efectos de la solución sobre el crecimiento

4.2.1.1 Crecimiento en agar – malta

Se estudia la inhibición o estimulación del crecimiento de los hongos en agar-malta producida por la solución proveniente del proceso de reciclado a diferentes concentraciones. Se determina la medida del área de las colonias miceliales en mm² y se calcula la velocidad inicial de crecimiento. La medida de la toxicidad de la solución se determina como CIM.

Se realiza el mismo diseño experimental que el empleado con la mezcla de sulfatos e iguales concentraciones de solución, con el propósito de comparar resultados. La figura 4.2 muestra la evolución del crecimiento de los basidiomycetes durante el tiempo de cultivo, a distintas concentraciones de la solución adicionadas al medio.

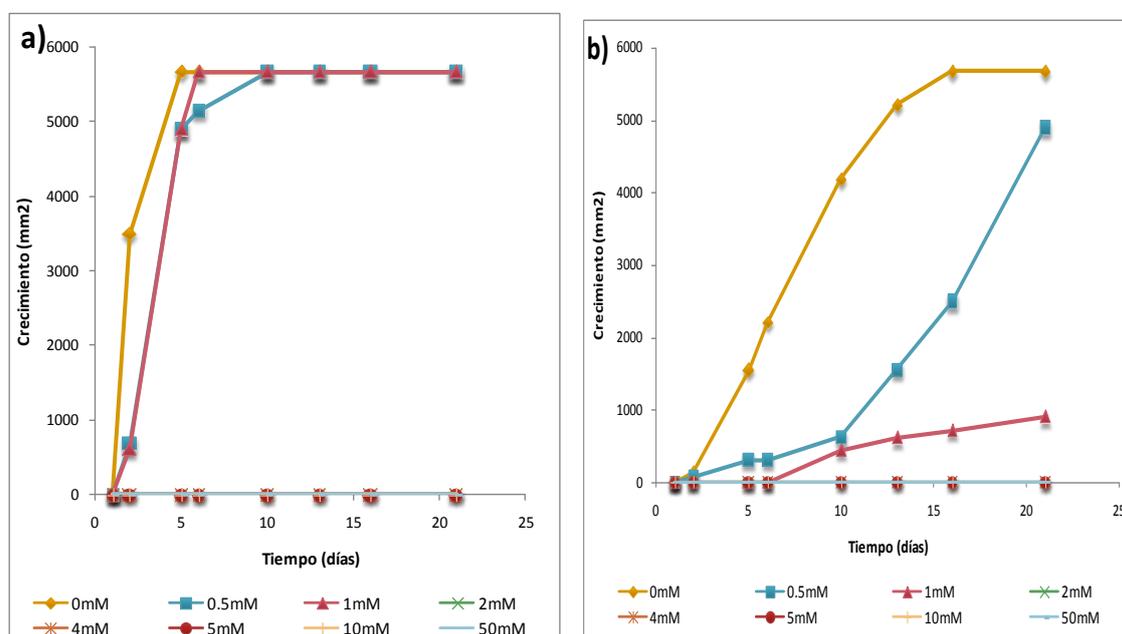


Figura 4.2: Curva de crecimiento en presencia de la solución proveniente del reciclado de pilas:

a) *P. chrysosporium*. 0,5 mM y 1mM en Zn se superponen; b) *P. atropurpurascens*.

En concordancia con los resultados anteriores (2.2.2) *P. atropurpurascens* crece a menor velocidad que *P. chrysosporium*. Ambas especies presentan a 0,5 mM en Zn velocidades menores que sus respectivos controles, si bien *P. atropurpurascens* tiene a esa concentración en Zn una mayor diferencia de velocidad respecto al control. A una concentración de 1 mM en Zn *P. chrysosporium* posee

un perfil de velocidad similar al del control sin Zn, en tanto que *P. atropurpurascens* comienza a crecer recién después del día 10 de cultivo. Nuevamente *P. atropurpurascens* es ligeramente más sensible a la presencia de los metales.

La CIM para la solución proveniente del reciclado de pilas es 2 mM en Zn para ambos hongos. Este valor es menor al obtenido para la solución de sulfatos de Zn y Mn y está por debajo del rango de valores de CIM para hongos de la podredumbre blanca, 5-15 mM en Zn que es próximo al del cobre, 3-20 mM (Baldrian, 2003). Al agregar la mezcla de ZnSO₄ y MnSO₄ puros en el medio, la CIM hallada para *P. chrysosporium* es de 5 mM en ZnSO₄ (2,5 mM de MnSO₄), mientras que frente a *P. atropurpurascens* la CIM de la mezcla es 4mM en ZnSO₄ (2 mM de MnSO₄). Las diferencias observadas son originadas por el efecto de la matriz que acompaña los metales en la solución en estudio, que contiene otros metales a nivel de trazas. Estos metales actúan sinérgicamente al Zn favoreciendo el efecto funguicida de la solución.

Si bien se verifica una escasa variabilidad intraespecífica en respuesta a la presencia de la solución ensayada en el medio (a diferencia de lo que ocurre con los sulfatos puros), los resultados permiten reconocer entre los basidiomicetes estudiados, la mayor tolerancia de *P. chrysosporium* a la solución en estudio y a los metales en general, lo cual coincide con la literatura (Baldrian, 2003). El crecimiento de *P. chrysosporium* no es inhibido por la presencia de 15 mM de Zn en medio líquido a 30°C, a la vez que es capaz de crecer en sustratos con altas concentraciones de diversos metales (Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺) ya que puede acumularlos en su citoplasma (Baldrian, 2003; Munir *et al.*, 2004).

4.2.1.2 Crecimiento de los hongos en madera

Ensayos según norma EN113:1996

Una vez conocida la actividad funguicida de la solución proveniente del reciclado de pilas en medio nutriente se estudia su efecto cuando los hongos crecen sobre madera. El estudio se realiza tomando como referencia la norma EN113: 1996, "Protectores para madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomicetos destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos". Estos ensayos son diferentes a los realizados sobre medios nutrientes; la actividad del preservante está influenciada por factores únicos en cada ensayo. Esto ocurre a pesar de reducir la variabilidad inherente a los ensayos, al usar los mismos medios, la misma madera, preservantes y microorganismos (Archer *et al.*, 1995). En consecuencia no se pueden correlacionar entre sí los valores de CIM obtenidos en cada ensayo. Las concentraciones en Zn fueron determinadas considerando la concentración máxima de Zn lograda en el proceso de reciclado de pilas (aproximadamente 3% en Zn) y dos diluciones sucesivas al medio. De la norma se mantienen las condiciones de cultivo, las etapas previas al ensayo de preparación de las probetas, los criterios de selección de las mismas y dos de las especies consideradas obligatorias que validan en ensayo (*Coriolus versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*). La figura 4.3 muestra fotografías de varias etapas del ensayo.



a) Probetas de pino secas.



b) Cilindro de impregnación diseñado



c) Incubación probetas expuestas a hongos.



d) Probeta de pino y *P.atropurpurascens* a 12 semanas



e) Probetas pino con *P.atropurpurascens*



f) Probetas pino con *P.chrysosporium*.



g) Controles con *P.chrysosporium*

Figura 4.3: Armado del ensayo basado en la norma EN 113 (a – g).

La norma establece que el producto preservante testado brinda protección a la madera cuando se tiene una pérdida de masa corregida menor del 3% de su masa seca inicial y no se tiene más de una probeta con pérdida de peso entre 3 y 5%, de las cuatro probetas de cada especie, frente a cada hongo

para cada concentración. La corrección se realiza respecto a otros factores de deterioro que no sean el ataque por los hongos a lo largo de las 16 semanas del ensayo.

Las probetas de pino fueron colonizadas por los basidiomycetes ensayados a excepción de *P.chrysosporium*, mientras que las de eucalipto solo fueron colonizadas por *C. versicolor* lo cual se confirmó por inspección visual. Se evaluaron los resultados del control de virulencia, que son probetas no impregnadas incubadas en presencia de los hongos ensayados, que sirve para conocer el estado fisiológico de los hongos como degradadores de madera. Las pérdidas de peso mínimas aceptadas de las combinaciones hongo – tipo de madera, deben ser del 20% de acuerdo a la norma. Solo *C. versicolor* en eucalipto presenta una pérdida de masa de 10%, en los demás hongos el valor es menor (7 -9 %); sin embargo en pino las pérdidas de masa están entre 7 y 9 %.

Debido a una falla mecánica en el cilindro de impregnación, el tratamiento con solución a 1,5 % en Zn se modificó a vacío- presión atmosférica -vacío, por esto la retención de preservante a esa concentración de solución es igual aquella de la concentración anterior (0,8% en Zn). Culminado el ensayo, se obtuvieron las mismas pérdidas de masa en ambas concentraciones. Las pérdidas de masa de las probetas expuestas a cada hongo del ensayo son todas muy bajas, o cero en las tres concentraciones en Zn mayores (0,8 %, 1,5 % y 3 %). La tabla 4.1 presenta los resultados medios obtenidos para cada hongo y madera, a las distintas concentraciones de solución y retención del preservante.

a)

Concentración de la solución	Retención de preservante	Pérdida de masa corregida media
% en Zn	kg m ⁻³	%
0	0	4
0,8	5,6	0,1
1,5	2,6	0,3
3	35	0

b)

Hongo de prueba	Concentración de la solución	Retención de preservante	Pérdida de masa corregida media
	% en Zn	kg m ⁻³	%
<i>P.atropurpurascens</i>	0	0	11
<i>G. trabeum</i>	0	0	7,1
<i>C. versicolor</i>	0	0	7,6
<i>P.atropurpurascens</i>	0,8	11,0	0
<i>G. trabeum</i>	0,8	10,6	0
<i>C. versicolor</i>	0,8	10,6	0
<i>P.atropurpurascens</i>	1,5	9,5	0
<i>G. trabeum</i>	1,5	10,7	0
<i>C. versicolor</i>	1,5	9,3	3,1
<i>P.atropurpurascens</i>	3	42	0
<i>G. trabeum</i>	3	42	0

Tabla 4.1: Retención y pérdida de masa medias: a) para *C. versicolor* en eucalipto; b) para los otros hongos en pino.

Como resultado del ensayo, se establece el límite tóxico superior para las combinaciones preservante-madera-hongo expresado en kg /m³ de preservante, en las condiciones en que se realizó el

ensayo (tabla 4.2). Esto se debe a que la concentración más baja empleada (0,8% en Zn) inhibe el crecimiento en todos los hongos ensayados lo cual impide determinar la concentración mínima inhibitoria.

Basidiomycetes ensayados	Madera	Retención (kg/m³)
<i>P.atropurpurascens</i>	Pino	11,1
<i>G. trabeum</i>	Pino	10,6
<i>C. versicolor</i>	Pino	9,3
<i>C. versicolor</i>	Eucalipto	5,6

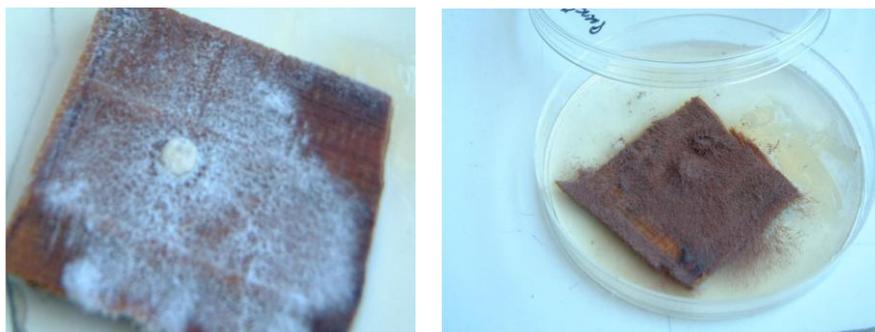
Tabla 4.2: Límite tóxico superior de la solución proveniente del proceso de reciclado (kg/m³).

La solución utilizada resultó demasiado tóxica para los basidiomycetes en estudio ya que hubo inhibición del crecimiento en la menor concentración ensayada. Se debían probar concentraciones más bajas e intermedias a las usadas para encontrar los valores umbrales de la solución y la concentración inhibitoria mínima. Esto se llevó a cabo en los ensayos con minibloques.

Readaptación de los hongos al crecimiento en madera

Tanto en los controles de virulencia (muestras no tratadas) como en las probetas impregnadas, las pérdidas de peso obtenidas son muy bajas. Una posible causa es que los hongos hayan visto disminuída su capacidad de degradación de la madera por haber sido mantenidos largos períodos en medios nutrientes artificiales. Por esta razón, se realiza una readaptación de los hongos al sustrato madera, cultivandolos primero en *Sweetgum* (*Liquidambar styraciflua*), para pasarlos luego a chips de pino y eucalipto (figura 4.4). La madera del *Sweetgum* se caracteriza por sus fibras que tienen una pared secundaria extremadamente gruesa además de ser susceptible al ataque tanto de hongos de podredumbre blanca como marrón y es usada como *feeder strip* en ensayos de deterioro de madera en contacto con suelo (Cowling, 1961; Wilcox, 1968; De Groot *et al.*, 1998); es rica en azúcares solubles y por lo tanto más fácil de colonizar que el pino y el eucalipto. Con esto se busca incrementar su virulencia de modo que no sea un factor a considerar en la evaluación de este nuevo ensayo.

Luego de dos repiques consecutivos de cada uno de los basidiomycetes sobre madera de *Sweetgum* y sobre chips de pino y eucalipto, se obtuvieron incrementos en las pérdidas de peso de las probetas de pino y eucalipto, expuestas por dos semanas a los 4 basidiomycetes del ensayo superiores al 20%. Estos microorganismos son los que se emplean en el ensayo con minibloques.



Figuras 4.4: Readaptación en *Sweetgum* de *P. chrysosporium* y *P. atropurpurens*.

Este fue el primer estudio realizado para determinar la concentración mínima de solución que inhibe el crecimiento de los hongos sobre madera. Por razones de tiempo y costos este tipo de ensayo se repitió solamente para evaluar si se producían cambios en el poder fungicida de la solución proveniente del reciclado, al introducir modificaciones operativas que disminuían costos en el proceso (Ibáñez *et al.*, 2008). En ese estudio también se evaluó el potencial insecticida de la solución y su lixiviación de la madera, que disminuye las propiedades fungicida e insecticida de la solución con el transcurso del tiempo. Por lo tanto la concentración inhibitoria mínima se determinó mediante ensayos de minibloques.

Ensayos en minibloques

Los ensayos con minibloques de *Pinus taeda* y *Eucalyptus grandis* son más simples, rápidos y económicos que los ensayos basados en la norma EN 113:1996. Si bien no permiten determinar con exactitud el umbral tóxico, permiten estimarlo y evaluar las retenciones utilizadas (Bravery, 1978; Brown *et al.*, 1991; Humar & Poloven, 2005).

En los ensayos de acuerdo a la norma EN113:1996 una concentración de solución de 3% en Zn de la solución en estudio (retención 42 kg/m³), inhibió el crecimiento micelial sobre madera. Lo mismo sucedió al aplicar la mezcla de sulfatos puros de Zn y Mn en relación 2:1, 3% en Zn (1,5% en Mn) inhibió totalmente el crecimiento micelial sobre madera de pino. En consecuencia se ensayaron con minibloques concentraciones de solución proveniente del proceso de reciclado de pilas inferiores a 3 % en Zn, considerando además que el efecto inhibitorio de dicha solución es mayor (CIM menor) al de los sulfatos puros en los ensayos en medio nutriente. Se impregnaron los minibloques a 0,08%, 0,6% y 1,6% en Zn y se expusieron a los basidiomycetes por cuatro semanas a 28 °C y 70% HR. La tabla 4.3 muestra las pérdidas de masa de los minibloques para cada especie y para cada tipo de madera ensayada.

a)	Control		0,08% Zn		0,6%Zn		1,6%Zn	
			Retenc. 0,8kg/m ³		Retenc. 5,7kg/m ³		Retenc. 15,2kg/m ³	
	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.
<i>P. chrysosporium</i>	43,5	3,1	11,8	0,9	14,4	1,3	25,2	4,9
<i>P. atropurpurascens</i>	66,3	3,6	42,2	4,6	36,5	2,8	7,0	0,87
<i>C. versicolor</i>	33,1	1,7	23,2	7,3	48,4	4,3	40,7	3,8
<i>G.trabeum</i>	37,7	1,2	24,7	2,7	19,8	2,9	8,7	1,2

b)	Control		0,08% Zn		0,6%Zn		1,6%Zn	
			Retenc. 0,8kg/m ³		Retenc. 5,7kg/m ³		Retenc. 15,2kg/m ³	
	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.	Perdida masa(%)	Des.est.
<i>P. chrysosporium</i>	62,1	2,4	42,7	1,2	27,3	1,9	26,3	1,4
<i>P. atropurpurascens</i>	23,4	1,6	39,7	0,6	20,9	0,8	19,6	2,3
<i>C. versicolor</i>	60,9	6,3	34,9	2,3	30,8	2,2	25,8	1,9
<i>G.trabeum</i>	36,7	2,3	32,1	1,0	18,6	2,9	15,1	3,0

Tabla 4.3: Pérdida de masa en los minibloques expuestos a las especies de hongos.

a) minibloques de pino; b) minibloques de eucalipto.

Las pérdidas de masa de los controles sin tratar fueron mayores del 20 % frente a las especies de hongos ensayadas, lo que valida el ensayo (Brown *et al.*, 1991).

A una retención de la solución en estudios de 15,2 kg/m³ (corresponde a 1,6 % en Zn), los minibloques de pino se encuentran desprotegidos, ya que frente a todos los basidiomycetes ensayados las pérdidas de masa fueron mayores a 3 %. Se puede observar además que la solución tiene un efecto inductor del crecimiento micelial sobre madera de pino para *P.chrysosporium* y *C. versicolor*; *P. atropurpurascens* no muestra este efecto. Esto debe tenerse en cuenta al evaluar la lixiviación de la solución de la madera. Aunque esta sea impregnada con una retención de 42 kg/m³, al disminuir la cantidad de metal en la madera por efecto de la humedad, se pueden alcanzar concentraciones metálicas que favorezcan el deterioro por inducir el crecimiento de los microorganismos. Las probetas de eucalipto también se encuentran desprotegidas a la mayor retención de solución ensayada (15,2 kg/m³). Por lo tanto para ambos tipos de madera, la concentración inhibitoria mínima de la solución es 3 % en Zn.

Para corroborar el deterioro se observa al microscopio finos cortes de aquellos minibloques que hayan presentado pérdidas de masa mayores a 3 %. En la figura 4.5 se muestran dos cortes de probetas de pino expuestas a *P. atropurpurascens*, donde se ve el ataque a la laminilla media y a *G. trabeum* donde se ve la erosión de la pared, su afinamiento.

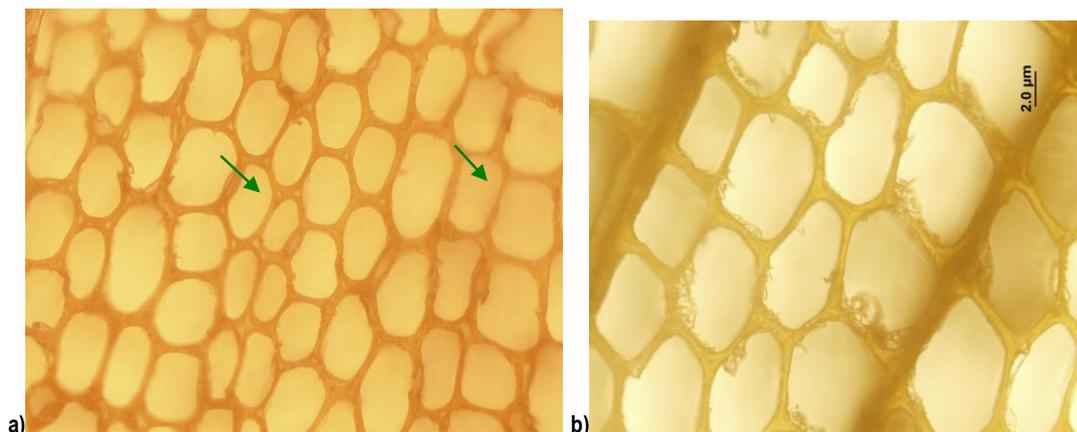


Figura 4.5: Corte transversal de pino atacado por: a) *P. atropurpurascens* b) *G. trabeum* luego de 4 semanas de cultivo. Pueden observarse la separación entre las células y las perforaciones en los ángulos de las mismas.

4.2.2 Efectos de la solución sobre las enzimas ligninolíticas

4.2.2.1 Degradación de colorantes orgánicos

Verificada la influencia inhibitoria de la solución en estudio sobre el crecimiento micelial se analiza su efecto sobre la actividad enzimática, debido a que los metales que contiene son potentes inhibidores de las reacciones enzimáticas. Su toxicidad es más notoria frente a las enzimas extracelulares, porque deben enfrentarse a distintas concentraciones metálicas en el medio sin estar protegidas por los mecanismos de detoxificación metálica que actúan en el interior de la célula (Baldrian, 2003). Para evaluar el efecto de la solución en estudio sobre el sistema ligninolítico de los hongos de la podredumbre blanca de la madera, se analiza la degradación de los colorantes poliméricos agregados al medio, por efecto de las enzimas ligninolíticas producidas por los hongos (Borokhov *et al.*, 2000).

La tabla 4.4 presenta la velocidad inicial de decoloración del medio ($\text{mm}^2/\text{día}$) y el porcentaje de decoloración, ambos al día 10 de cultivo considerando que el 100% corresponde a la placa totalmente decolorada, para cada especie ensayada.

P. chrysosporium degrada rápidamente el RBBR y Poly-R 478 en el cultivo control y presenta mayor velocidad inicial de decoloración que *P. atropurpurascens*. Al agregar la solución ensayada a una concentración de 0,5 mM en Zn, *P. atropurpurascens* sufre una marcada disminución de su velocidad de decoloración del RBBR y de Poly-R 478; no así *P. chrysosporium* que a pesar de presentar un perfil de decoloración análogo al del control sin metal, su velocidad inicial de decoloración se incrementa ligeramente respecto al control. Este resultado difiere del obtenido con los sulfatos puros de Zn donde no había decoloración ni a la menor concentración de metal ensayada y con los resultados obtenidos por Pointing (Pointing *et al.*, 2000), que asevera que *P. chrysosporium* cultivado en medio líquido en presencia de sales metálicas puras a cualquier concentración (Cu, Zn, etc) no decolora Poly-R 478.

<i>a)P.chrysosporium</i>	Concentración solución (mM)	RBBR		Poly-R	
		Decoloración (%)	Vel. dec. Inicial(mm/d)	Decoloración (%)	Vel. dec. Inicial(mm/d)
	0	100	6,24	100	6,22
	0,5	100	7,31	100	7,24
	1	100	7,31	0	0
	2	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	50	0	0	0	0

<i>b)P. atropurpurascens</i>	Concentración solución (mM)	RBBR		Poly-R	
		Decoloración (%)	Vel. dec. Inicial(mm/d)	Decoloración (%)	Vel. dec. Inicial(mm/d)
	0	60,3	4,03	60,1	3,96
	0,5	50,3	3,51	23,3	1,47
	1	6,5	0,37	0	0
	2	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	50	0	0	0	0

Tabla 4.4: Velocidad inicial y decoloración de RBBR y Poly-R 478 en placa por efecto de la solución proveniente del reciclado.

Esto significa que algún componente a nivel de traza de la solución metálica proveniente del proceso de reciclado a bajas concentraciones, estimula la actividad enzimática de *P. chrysosporium* que se hace más tolerante a la presencia de los metales. Además se puede observar que a una concentración de 1 mM en Zn, tanto *P.chrysosporium* como *P. atropurpurascens* decoloran al RBBR, pero no decoloran al Poly-R 478.

Al comparar los resultados obtenidos con los de los sulfatos puros, se observa que la respuesta depende del hongo considerado. Sin embargo el efecto inductor de la actividad ligninolítica del Mn, se evidencia en *P. atropurpurascens* que presenta una CIMD de 50 mM en Zn (25 mM en Mn), similar a la presentada por el sulfato puro de Mn. El valor de la CIMD es dependiente del colorante del medio: la CIMD de la solución en estudio es de 2 mM en Zn frente a RBBR, pero es 1 mM en Zn frente a Poly-R 478 para ambos basidiomycetes.

4.2.2.2 Actividades de MnP, LiP y Lac determinadas espectrofotométricamente

Se determina el efecto de la solución proveniente del reciclado de pilas sobre la actividad de cada una de las enzimas del sistema ligninolítico: LiP, MnP y Lac en ambos hongos. Las determinaciones se realizan de acuerdo a las siguientes referencias: Tien y Kirk (1988), Castillo *et al.* (1994) y Galiano *et al.* (1991), respectivamente (Materiales y Métodos)¹

¹ Evitando introducir factores de variabilidad se hicieron todos los ensayos con la misma partida de solución, por eso el diseño experimental es diferente al de los sulfatos puros, se ensayan solo 4 concentraciones por tener poca cantidad de solución.

Ambos hongos se cultivan en agua de malta al 1,25 %, a 28°C y 150 rpm. La tabla 4.7 muestra la variación de la actividad enzimática en dos situaciones: cuando los hongos crecen en un medio de cultivo que contiene la solución en estudio, y cuando la solución en estudio es agregada a las enzimas preformadas, a una concentración de 1 mM. Ambas determinaciones se realizan sobre el sobrenadante del día 16 de cultivo.

a) *P. chrysosporium*

Concentración solución (mM)	Actividad enzimática (mU)				
	0	1	5	10	Enzima preformada
MnP	57	34	1	6	7
LiP	23	0	0	0	1
Lac like	54	9	9	5	3

b) *P. atropurpurascens*

Concentración solución (mM)	Actividad enzimática (mU)				
	0	1	5	10	Enzima preformada
MnP	10	5	0	0	2
LiP	1	1	1	1	1
Lac	13	2	2	6	3

Tabla 4.5: Actividad enzimática determinada espectrofotométricamente. Cultivos en presencia de la solución a distintas concentraciones y determinada sobre la enzima preformada a la cual se agrega solución en estudio a una concentración final de 1 mM en Zn.

En las condiciones del ensayo el día 16 de cultivo, *P. chrysosporium* presenta mayores valores de actividad en el control sin metal, que *P. atropurpurascens*. Se observa que la solución en estudio presente en el medio de cultivo produce una clara disminución de la actividad enzimática en las tres enzimas ligninolíticas, a partir de 1 mM. Esta inhibición también ocurre en la enzima preformada a la que se agregó la solución en estudio a una concentración final de 1 mM en Zn, que es la menor CIMD de la solución en cultivos sólidos en placa. En este último caso los metales de la solución, producen un envenenamiento de las enzimas que conduce a la pérdida de actividad.

Los resultados obtenidos son concordantes con los ensayos en placa ya que no hay degradación de los colorantes poliméricos entre 1 y 2 mM en Zn (según el colorante considerado), mientras que la inhibición de la actividad determinada espectrofotométricamente ocurre a 1 mM en Zn.

4.2.3. Ensayo de campo: cementerio de estacas

Una vez conocidas las propiedades funguicidas e insecticidas (ver 4.2.4) de la solución proveniente del proceso de reciclado de pilas, se plantea el empleo de la solución tratando madera en contacto con el suelo. Para ello se estudia la durabilidad adquirida en madera de pino impregnada con la solución, expuestas a la intemperie en un cementerio de estacas. El ensayo está basado en la norma EN

252: "Ensayo de campo para determinar la eficacia relativa de un protector de madera en contacto con el suelo". En Materiles y Métodos se encuentran los detalles del diseño del ensayo, así como el análisis estadístico empleado. La tabla muestra la denominación de las probetas junto a la descripción de los tratamientos realizados y la retención de solución del reciclado lograda en cada caso. Obsérvese que cada nivel de retención está dividido en tres tipos de probeta: 5 solo con la solución, 10 con doble tratamiento: una vez estacionadas las probetas ya impregnadas con la solución del reciclado, se les aplica borax por pincelado (5 probetas) y a vacío- presión (5 probetas). La figura 4.6 muestra el cementerio de estacas y fotografías obtenidas en la segunda evaluación del cementerio.

Denominación	Tratamiento	Retención en Zn (kg.m ⁻³)
A1	0,8%Zn	1,17
A2	0,8%Zn+B Pinc	
A3	0,8% Zn + B vpv	
B1	1,5% Zn	2,91
B2	1,5%Zn + B pinc.	
B3	1,5%Zn + B vpv	
C1	3%Zn	7,37
C2	3%Zn + B pinc	
C3	3%Zn + B vpv	
D1	6%Zn	21,22
D2	6% Zn + B pinc.	
D3	6%Zn + B vpv	
E	Blanco	
F	CCA 8 kg.m ⁻³	
G	CCA 12 kg.m ⁻³	

Tabla 4.6: Denominación y descripción de los tratamientos del ensayo

A 20 meses de instalado el cementerio de estacas, el tratamiento de la madera con una concentración de Zn del 3% y el bórax aplicado con presión vacío (C3) es el de mejores resultados.

Los tratamientos solo con Zn, sin proceso antilixivante posterior, son de resultados erráticos. La tendencia hasta el momento indica que el mejor tratamiento antilixivante con bórax es cuando se aplica por vacío y presión.

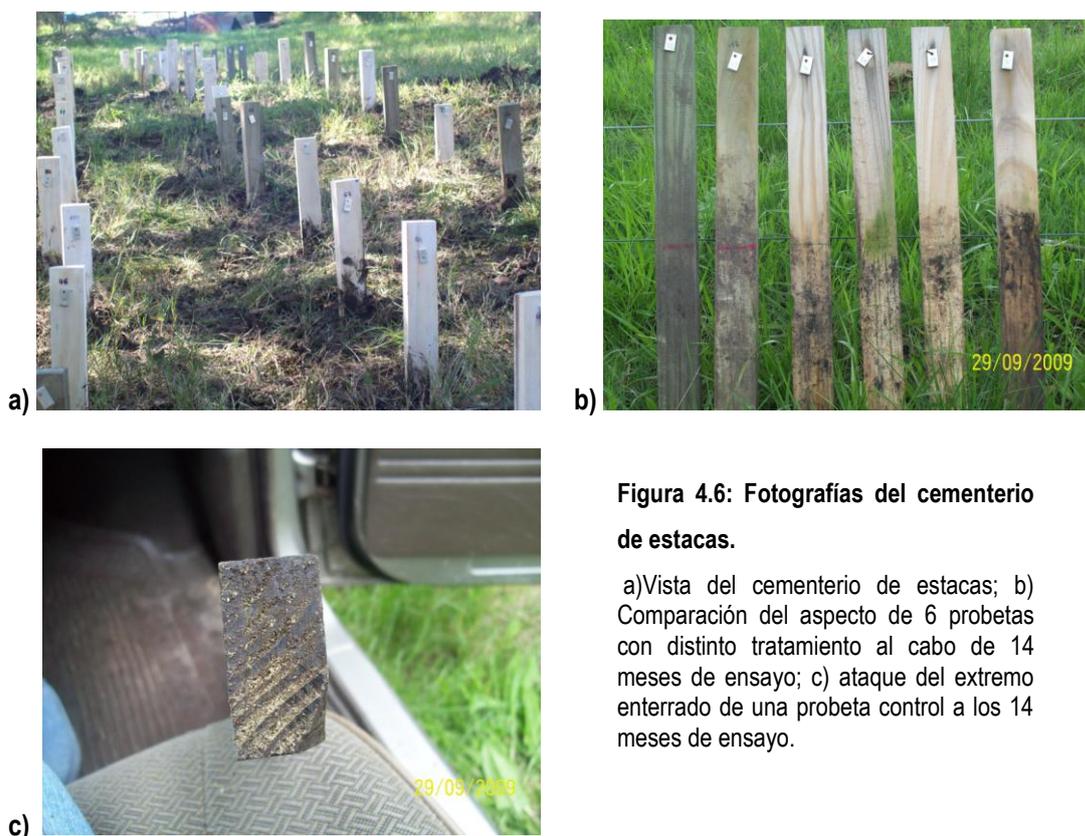


Figura 4.6: Fotografías del cementerio de estacas.

a) Vista del cementerio de estacas; b) Comparación del aspecto de 6 probetas con distinto tratamiento al cabo de 14 meses de ensayo; c) ataque del extremo enterrado de una probeta control a los 14 meses de ensayo.

Los resultados de las evaluaciones se encuentran en el anexo, en manuscrito presentado al 2^{do} Congreso de la Red Iberoamericana de Protección de la Madera, Mar del plata, Argentina (12/2010).

4.2.4 Ensayos adicionales

Se estudió como se veían afectadas las propiedades funguicidas de la solución en estudio ante determinadas modificaciones operativas en el proceso de reciclado que disminuían los costos (cambio en el sistema de separación sólido – líquido). Para ello se realizó el ensayo basado en la norma EN113 con probetas de *Pinus taeda* y *Eucalyptus grandis*, con cepas de *Fomitopsis palustris* y *Coriolus versicolor*. Previo a este ensayo se realizaron ensayos de deslavado de la solución desde la madera (o envejecimiento acelerado) basados en la norma *Japanese Industrial Standard K 1571 (JIS 2004)*, en el cual las probetas tratadas con la solución en estudio y estacionadas son colocadas en agua destilada en determinadas condiciones (26°C, 8 horas, 10 veces). Finalmente son secadas y expuestas a los basidiomycetes. También se determinaron las propiedades insecticida frente a termitas (*Coptotermes formosanus*), empleando la norma *JWP-TW-P1 (JWPA 2001)*. Los resultados mostraron que el cambio operativo propuesto afecta negativamente las propiedades funguicidas de la solución, en tanto las propiedades insecticidas arrojan una mortandad de 100 %. La lixiviación de la solución producida por el deslavado que simula condiciones reales de alta humedad, disminuye la protección de la madera tanto

contra hongos como contra insectos (Ibáñez *et al.*, 2008). Cabe comentar que este trabajo es previo al cementerio de estacas, por eso se trata de buscar un producto adicional que forme compuestos insolubles en agua que impidan que la madera quede desprotegida cuando está expuesta a la intemperie.

4.3 Resumen de los resultados

Cuando se ensaya la solución obtenida a partir del proceso de reciclado de pilas en medio nutriente se observa efectos análogos a los producidos por los sulfatos puros, inhibe el crecimiento y la actividad ligninolítica de los basidiomycetes ensayados. Puede pensarse que no hay un efecto antagónico de los componentes de la matriz en la que se encuentran los metales en la solución obtenida en el reciclado de pilas respecto a las sales de los metales. La CIM en medio sólido nutriente es de 2 mM en Zn y puede considerarse baja. La CIMD es 1 mM en Zn para ambos hongos frente a Poly-R 478 y se encuentra entre 1 y 5 mM frente a RBBR. Las determinaciones espectrofotométricas de las enzimas corroboran la influencia de la solución sobre la actividad ligninolítica.

Cuando el crecimiento se produjo sobre madera, se obtiene protección adecuada a una concentración de 3 % en Zn. Estos resultados son similares a los obtenidos con los sulfatos puros. Se observa nuevamente un efecto rebote a una concentración de 1,5% en Zn, aquí se observa una mayor pérdida de peso correspondiente a un mayor crecimiento fúngico.

5 – CONCLUSIONES

5 - CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten responder la principal interrogante planteada en este trabajo: la solución rica en zinc y manganeso que se obtiene del proceso hidrometalúrgico de reciclado de pilas domésticas puede ser utilizada como conservante de madera. Presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico y sobre las enzimas del sistema ligninolítico a todos los niveles ensayados.

En términos generales la mencionada solución presenta una actividad fungicida ligeramente mayor a la mezcla de sulfatos de zinc y manganeso puros en relación 2:1. En consecuencia la matriz que contiene al zinc y al manganeso en la solución tiene un ligero efecto fungicida sinérgico con el zinc.

La solución del proceso de reciclado a una concentración de 3% en zinc, puede emplearse como preservante de madera en contacto con el suelo y a la intemperie, siempre que se aplique un segundo tratamiento antilixiviante que evite la pérdida de los metales de la misma. La aplicación de bórax (mediante un tratamiento a vacío -presión -vacío) a maderas previamente tratadas con la solución evita su lixiviación. El resultado de la evaluación del deterioro, la dureza superficial y la resistencia de las probetas así tratadas a dos años de colocadas en suelo, es análogo al obtenido con probetas tratadas con CCA a 12kg/m³.

En los estudios realizados con las soluciones de sales de zinc y manganeso puras se pudieron apreciar distintos comportamientos cepa dependiente. El crecimiento micelial de *P.atropurpurascens* es más sensible a los metales en estudio que aquel de *P.chrysosporium*; sin embargo en lo que respecta a la actividad enzimática este hecho se invierte ya que a determinadas concentraciones de metales la actividad enzimática de *P.atropurpurascens* no se ve afectada. Se observa un efecto estimulante del metabolismo fúngico cuando estos crecen en presencia de manganeso. Cuando se ensaya la mezcla de los metales, se observa un cierto efecto antagónico sobre las actividades deletéreas del zinc.

El zinc es inhibidor de la expresión de los genes *mnp* de ambos basidiomycetes. A nivel de expresión de los genes de las manganeso peroxidasas en *P. chrysosporium*, se observa un marcado efecto regulatorio de los metales sobre el nivel de transcritpo del gen *mnp1*; este efecto es un orden de magnitud menor en *mnp2* y *mnp3*.

El manganeso estimula (a todas las concentraciones ensayadas) la expresión de los genes *mnps* de *P. chrysosporium*, mientras que en *P. atropurpurascens* se aprecia un efecto inductor a bajas concentraciones y un efecto inhibitor a concentraciones mayores a 1 mM.

En el caso de la mezcla su efecto frente a las *mnps* de *P.chrysosporium*, a las mayores concentraciones es inhibidora de la expresión; en las concentraciones menores tiene un efecto intermedio a aquel de los metales por separado a igual concentración. La mezcla de metales impidió el crecimiento de *P.atropurpurascens* a todas las concentraciones ensayadas, en consecuencia no se pudo determinar el efecto de la mezcla de metales sobre la expresión génica.

Se determinó por primera vez que *P.atropurpurascens* cuenta con al menos siete proteínas MnPs diferentes, con alta similaridad con las MnPs de otros basidiomycetes. Una de estas proteínas presenta redundancia génica ya que es codificada por dos genes diferentes, mientras que otra de estas proteínas presenta características en su estructura que la aproximan a las MnP no típicas.

Se comprueba que los metales estudiados tienen efecto sobre las enzimas del sistema ligninolítico por distintos mecanismos. Actúan sobre el crecimiento global, e influyen en los niveles de expresión de dichas enzimas pero al mismo tiempo son capaces de “envenenar” en el medio extracelular a las enzimas preformadas. Si bien se espera una correlación entre estas dos últimas instancias se puede observar en los cultivos sin metal que la actividad manganeso peroxidasa máxima ocurre entre 2 y 5 días después que se alcanza la mayor expresión de sus genes, dependiendo del basidiomycete considerado. En presencia de los metales esta correlación se pierde porque el efecto producido por estos es el mismo en ambos momentos de la biogénesis – actividad de estas enzimas. El zinc es inhibidor de ambos, actividad enzimática y expresión génica; el manganeso por el contrario tiene un efecto que varía con el basidiomycete. Es inductor de la actividad de las MnPs y la expresión génica en *P.chrysosporium*, mientras que en *P.atropurpurascens* inhibe a ambas a concentraciones mayores a 1 mM.

PERSPECTIVA GLOBAL

El encontrar un uso a la solución rica en zinc obtenida a partir del reciclado de pilas domésticas, presenta varios beneficios. Por un lado el comienzo del desarrollo de un preservante para madera de muy baja toxicidad como el zinc, que utilizado adecuadamente no produce daños a la salud, seguridad y riesgo ambiental. Este planteo acompaña la tendencia mundial al desarrollo de nuevos productos preservantes para madera que tiendan a reducir el uso principalmente de CCA en situaciones en las que la madera en servicios no deba conservarse por décadas. Por otra parte, se encuentra otra utilidad para un subproducto obtenido del proceso de reciclado de pilas domésticas. Disminuye la contaminación surgida de su disposición final, se aprovechan los materiales contenidos en las mismas, a la vez que se da mayor viabilidad al proceso al encontrar una aplicación con una continuidad de uso definida por la creciente forestación del país. Se deberían realizar futuros estudios de aplicación de otros tratamientos antilixivantes, así como optimizar el uso de bórax, con sus propiedades ignífugas y antifúngicas.

Con el fin de conocer las posibles rutas metabólicas de los hongos que puedan ser interrumpidas por un preservante para madera de esta naturaleza, sería sumamente interesante ver la influencia de los metales sobre las restantes enzimas del sistema ligninolítico, así como sobre las enzimas celulolíticas. En las condiciones actuales del conocimiento y equipamiento, se podrían realizar estudios de expresión sobre el propio sustrato a tratar (madera). Asimismo, estudios sobre los efectos post-transcripcionales de

las MnPs arrojaría más información sobre la influencia de los metales sobre estas enzimas, y por ende el mecanismo de acción completo.

Una mayor caracterización del genoma y del sistema manganeso peroxidasa en particular de *P. artropurpurascens* permitiría redondear los estudios iniciados con este trabajo.

6 – BIBLIOGRAFÍA

5 - BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. Norma: EN113:1996. Protectores de la madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomycetes destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos.
- AENOR. Norma: EN 252:1989, EN 252AC1:1989. Ensayo de campo para determinar la eficacia relativa de un protector de madera en contacto con suelo.
- Alborés S. 2002. Producción y caracterización de enzimas del sistema ligninolítico de *Punctularia atropurpurascens*. Tesina de la Licenciatura en Bioquímica (T2), Lab. Microb. Unidad Asociada de Quím. Biol., Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Alic M., Akileswaran L., Gold M.H. 1997. Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim. Biophys. Acta* 1338: 1 - 7.
- Andrade Tacca C., Duarte M. 2004. Acid leaching and electrochemical recovery of manganese from spent alkaline batteries. *Proceeding of 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering*. EMPROMER.
- Archer K., Nicholas D., Schultz T. 1995. Screening of wood preservatives: comparison of the soil – block, agar – block, and agar – plate test. *Forest Products Journal*. 45 : 86 – 89.
- Baldrian P., Gabriel J., Nerud F. 1996. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol.* 41 : 363 – 367.
- Baldrian P., Gabriel J. 1997. Effect of heavy metals on the growth of selected wood – rotting Basidiomycetes. *Folia Microbiol.* 42: 521 – 523.
- Baldrian P., Wiesche C., Gabriel J., Nerud F., Zadrazil F. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl. Environ. Microb.* 66: 2471 – 2478.
- Baldrian P., Gabriel J. 2002. Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood- rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia* 94: 428 – 435.
- Baldrian P. 2003 Interactions of heavy metals with white- rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 78-91.
- Baldrian P., Gabriel J. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters* 220: 235 –240.
- Barraco Vega M. 2009. Estudios de expresión génica de los transportadores de purinas en *Phanerochaete chrysosporium* mediante PCR en tiempo real. Tesina de la Licenciatura en Bioquímica (T2), Lab. Microb. Unidad Asociada de Quím. Biol. Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Baran E. 1994. Química Bioinorgánica, 1º edición Mc Graw- Hill.
- Bartolozzi M., Braccini G., Marconi P., Bonvini S. 1994. Recovery of zinc and manganese from spent batteries. Short communication. *Journal of Power Sources* 48: 389 – 392.
- Bernard P., Ajioka R., Kushner J., Wittwer C. 1998. Color multiplexing hybridization probes. *Am. J Pathol* 153: 1055 – 1061.
- Bernardes A.M., Espinosa D.C., Tenorio J.A. 2004. Recycling of batteries: a review of current processes and technologies. *Journal of Power Sources* 130: 291 – 298.

- Boerjan W., Baucher R. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519 – 546.
- Bogan B., Lamar R., Hammel K. 1996. Fluorene Oxidation In Vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and In Vitro during Manganese Peroxidase-Dependent Lipid Peroxidation. *Appl Environ Microbiol.* 62 (5):1788–1792.
- Borokhov O., Rothenburger S. 2000. Rapid Dye Decolorization Method for Screening Potencial Wood Preservatives. *Appl. Environ. Microb.* 66: 5457- 5459.
- Bravery A. 1978. A miniaturized wood – block test for the rapid evaluation of wood preservative fungicides. Paper 8. II Screening fungicides. Screening techniques for potential wood preservative chemicals. Document N° IRG/2113. *The International Research Group on Wood Preservation.*
- Brown J.A., Glen J.K., Gold M.H. 1990. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 172: 3125 - 3130.
- Brown J.A., Alic M., Gold M.H 1991. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J. Bacteriol.* 173: 4101 - 4106.
- Brown J., Caswell S., Williams G.1991. Development of a miniblock test method for the rapid evaluation of preservative performance against basidiomycete fungi. Document N° IRG/WP/2379. *The International Research Group on Wood Preservation.*
- Brown J.A., Li D., Alic M., Gold M.H 1993. Heat shock induction of manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Envirom. Microbiol.* 59: 4295 – 4299.
- Burdsall H.H., Eslyn W.E. 1974. A new *Phanerochaete chrysosporium* with a imperfect state. *Mycotaxon.*
- Burdsall H. Jr., 1981. The Taxonomy of *Sporotrichum pruinosum* and *Sporotrichum pulverulentum* / *Phanerochaete chrysosporium*. *Mycologia* 73 (4): 675-680.
- Bustin S., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. 2004. Quantitative real –time RT –PCR _ a perspective. Review. *Journal of Molecular Endocrinology.* 34 :597 -601.
- Castillo M.P., Stenstrom J., Ander P. 1994. Determination of manganese peroxidase activity with 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona y ácido 3-(dimetilamino) benzoico. *Annal. Biochem.* 218: 399 - 404.
- Castillo M. 1997. Degradation of pesticides by *Phanerochaete chrysosporium* in solid substrate fermentation. Doctor’s dissertation. ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-5285-6.
- Clausen C., Green III B., Woodward J., Evans J., DeGroot R. 2000. Correlation between oxalic acid production and copper tolerance in *Wolfiporia cocos*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 69 – 76.
- Cohen R., Suzuki M., Hammel K. 2004. Differential stress – induced regulation of two quinine reductases in brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology.* 70 (1): 324 – 331.
- Collins, P.J. and Dobson, A.D.W. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3444-3450.
- Collins_Hansen C., Andersen R., Steinnes E. 2005. Damage to DNA and lipids in *Botelus edulis* exposed to heavy metals. *Mycol. Res.* 109: 1386- 1396.
- Cookson L. J. 1995. Reliability of Poly-B-411, a Polymeric Anthraquinone-Based Dye, in Determining the Rot Type Caused by Wood-Inhabiting Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 801 - 803.

- Cowling E. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white rot and brown rot fungi. U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin N° 1258.
- Crawford D.M., Woodward B.M., Hartfield C.A., Comparison of Wood Preservatives in Stakes Test- 2000. Progress Report. Res. Note FPL–RN–02. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- Czupryn M, Brown WE, Vallee BL. 1992. Zinc rapidly induces a metal response element-binding factor. *Proc Natl Acad Sci*
- Curdová E., Vavruskova L., Suchánek M., Baldrian P., Gabriel J. 2004. ICP – MS determination of heavy metals in submerged cultures of wood – rotting fungi. *Talanta* 62: 483 – 487.
- De Azevedo F., Da Matta A. 2003. Metais: gerenciamento da toxicidade. Ed. Atheneu
- De Groot R., Evans J., Forsyth P., Freitag C., Morrell J. 1998. Soil contact decay test using small blocks. A procedural analysis. Forest Product Laboratory. Research Paper FPL-RP-571.
- Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. Wood. Decay, pests and protection. Chapman & Hall 1st ed.
- Edwards K. 2004. Cap.4: Performing real time PCR. In Real time PCR: an essential guide. Ed. by Kirstin E., Logan J., Saunders N. Horizon Bioscience. U.K. ISBN: 0 -9545232 – 7 –X. 347 pg.
- Eichlerová I., Homolka L., Lisá L., Nerud F. 2005. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichmitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* 60: 398 – 404.
- Eichlerová I., Homolka L., Nerud F. 2006. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochemistry* (41): 941 – 946.
- Elisashvili V. I. 1993. Physiological Regulation of Ligninolytic Activity in Higher Basidium Fungi. *Microbiology*. 62:480-487.
- Falih A. 1997. Influence of heavy metals toxicity on the growth of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosource Technology* 60: 87-90.
- Faraco V., Giardina P., Sannia G. 2003. Metal – responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155 – 2162.
- Ferraz A., Rodriguez J., Freer J., Baeza J. 2001. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi . *W. J. Microbiol. Biothechnol.* 17: 31 - 34.
- Freeman T., Lee K., Richardson P. 1999. Analysis of gen expression in single cells. *Curr Opin Biotechnol* 10: 579 – 582.
- Furuno T., Lin L., Katoh S. 2003. Leachability, decay, and termite resistance of wood treated with metabolates. *J. Wood Sci.* 49: 344 – 348.
- Gabriel J., Vosahlo J., Baldrian P. 1996. Biosorption of cadmium to mycelial pellets of wood-rotting fungi. *Biotechnol Techniques* 1: 345 - 348.

- Gabriel J., Baldrian P., Rychlovsky P., Krenzelok M. 1997. Heavy metal content in wood – decaying fungi collected in Prague and in the National Park Sumava in Czech Republic. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 595 – 602.
- Gabriel J., Baldrian P., Hladikova K., Háková M. 2001. Copper sorption by native and modified pellets of wood – rotting basidiomycetes. *Letters in Applied Microbiology* 32 : 194 - 198.
- Gadd, G M. 1990. In *Microbiol Mineral Recovery*. (eds Ehrlich, H.L., C. L. Brierley, C.L.) MC. Grew-Hill Book Co., New York, N.Y. 1990, pp: 249-276.
- Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol. Tansley Review* 47: 124: 25 – 60.
- Gadd G.M. 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv. Microm Physiol* 41: 47 – 92.
- Gadd G.M., Ramsay L., Crawford J., Ritz K. 2001. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. *FEMS Microbiology Letters* 204: 311-316.
- Galliano H., Gas G., Seris J.L., Boudet A. 1991. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two enzymes: MnP peroxidase and laccase. *Enz. Microb. Technol.* 13: 478 – 482.
- Gaskell, J., Stewart, P., Kersten, P., Covert, S., Reiser, J., Cullen, D., 1994. Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bio/Technology* 12, 1372–1375.
- Gettemy JM, Alic M, Gold M.H. 1997. Truncated-gene reporter system for studying the regulation of manganese peroxidase expression. *Curr. Genet.* 31: 519-524.
- Gettemy J.M., Ma B., Alic M., Gold M.H. 1998. Reverse transcription PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 569-574.
- Gibson U., Heid C., Williams P. 1996. A novel method for real time quantitative RT – PCR. *Genome Res.* 6: 995 – 1001.
- Gill P.K., Arora D.S. 2003. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 28 – 33.
- Glenn J.K., Akileswaran L., Gold M.H. 1986. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 688 – 696.
- Godfrey B.J., Mayfield M.B., Brown J.A., Gold M.H. 1990. Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase form *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 93: 119 -124.
- Gold M.H., Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *P. chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57: 605 - 622.
- Gold M.H., Brown J.A., Godfrey B.J., Mayfield M.B., Wariishi H., Valli K. 2000. Structure and Regulation of Manganese Peroxidase Gene from *P. chrysosporium*. *Enzymes in Biomass Conversion*. pp 189-199. G. F. Leatham, M. E. Himmel Eds. ACS Symposium Series.
- Green III F., Clausen C. 2003. Copper tolerance of brown – rot fungi: time course of oxalic acid production. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 51: 145 – 149.

- Guillén Y., Machuca A. 2008. The effect of copper on the growth of wood –rotting fungi and a blue stain fungus. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 31 – 37.
- Guiraud J., Galzy P. 1980. L`analyse microbiologique dans les industries alimentaires. 9na edición. Les Editions De L`usine.
- Gutiérrez M., Rojas L.A., Mancilla-Villalobos R., Seelenfreund D., Vicuña R., Lobos S. 2008. Analysis of manganese-regulated gene expression in the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Current Genetic* 54:163–173.
- Gutzmer D.I., Crawford D.M. 1995. Comparison of Wood Preservatives in Stakes Test- 1995 Progress Report. Res. Note FPL–RN–02. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- Hadacek F., Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis* 11: 137-147.
- Hammel K., Cullen D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*.11:349 – 355.
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1 – 11.
- Hartford W.H. 1973. Chemical and physical properties of wood preservatives and wood preservative systems. In: Wood deterioration and its prevention by preservative treatment, Vol.1 (ed. NicholasD.D.), Syracuse University Press, 1- 120.
- Hatvani N., Mécs I. 2003. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 199-203.
- Heid C., Stevens J., Livak K., William P. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986 – 994.
- Hernandez-Luna C., Gutierrez-Soto G., Salcedo-Martínez S. 2008. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 465 – 473.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real – time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 11: 1026 – 1030.
- Hofrichter . 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiol Technol* 30: 454 – 466.
- Holzbaur E., Tien M. 1988. Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *P. chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 626-633.
- Humar M., Pohleven F. .2005. Influence of a nitrogen supplement on the growth of wood decay fungi and decay of wood. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 34–39
- Hunt G.M., Garrat G.A. 1967. Wood Preservation. 3ed. Mc Graw Hill Book Co N Y.
- Ibáñez C., Rabinovich M., Kartal N., Mantero C., Cerdeiras M. 2008. Preservantes alternativos para madera obtenidos en un proceso de reciclado. *Revista Forestal Latinoamericana.* 43 (1): 91 – 102.
- International Congress for Battery Recycling, Procceding de 1995 a 2004.

- Imbert J., Zafarullah M., Culotta V.C., Gemadu L., Hamer D. 1989. Transcription factor MBF-I interacts with metal regulatory elements of higher eucariotyc metallothionein genes. *Molecular and Cellular Biology*. 9: 5315 – 5323.
- Janse B., Gaskell J., Akhtar M., Cullen D. 1998. Expression of *P. chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Applied and Environm. Microbiol.* 64: 3536 – 3538.
- James C.M., Felipe M.S.S., Sims P.F.G., Broda P. 1992. Expression of a single lignin peroxidase-encoding gene in *P. chrysosporium* strain ME446. *Gene* 114: 217-222.
- Jarosz-Wilkolazka A., Gadd G. 2003. Oxalate production by wood – rotting fungi growing in toxic metal- amended medium. *Chemosphere* 52: 541-547.
- Jellison J., Conolly J., Goodell B., Doyle B., Illman B. 1997. The role of cations in the biodegradation of wood by brown rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39: 165- 179.
- Kamei I., Daikoku C., Tsutsumi Kondo R. 2008. Saline-Dependent Regulation of Manganese Peroxidase Genes in the Hypersaline-Tolerant White Rot Fungus *Phlebia* sp. Strain MG-60. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (9): 2709-2716.
- Kamitsuji H., Honda Y., Watanabe T. Kuwahara M. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 287–294.
- Kartal S. N., Dorau B. F., Lebow S. T., Frederick Green III. 2004. Effects of inorganic ions on leachability of wood preserving N'-hydroxynaphthalimide (NHA) Forest Prod. J. 54(1):80-84.
- Kersten P., Kirk K. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 169 (5): 2195 – 2201.
- Kersten P., Cullen D. 2007. Extracellular oxidative system of the lignin – degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetic and Biology*. 44: 77 – 87.
- Kirk T., Farrell R.L. 1987. Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Klaassen C. 1996. Casarett & Doull 's Toxicology. The basic science of poisons.Ed. Mc Graw Hill, Fifth edition.
- Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *P. chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250.
- Laks P., Manning M. 1995. Preservation of wood composites with zinc borate. IRG/WP 95- 30074. International Research Group on Wood Protection. Stockholm, Sweden.
- Larrondo L., Salas L., Melo F., Vicuña R., Cullen D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6257-6263.
- Larrondo L., González B., Cullen D., Vicuña R. 2004. Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the *mco* transcripts. *Microbiology* 150: 2775 – 2783.
- Larrondo L., Vicuña R., Cullen D. 2007. *Phanerochaete chrysosporium* Genomics. *Applied Mycology and Biotechnology. Genes and genomics*. 14. Vol. 5.

- Lay M., Wittwer C. 1997. Real time fluorescence genotyping of Factor V leiden during rapid cycle PCR. *Clin Chem* 43: 2262 – 2267.
- Lee M., Squirrell D., Leslie D., Brown T. 2004. Cap. 3: Homogeneous fluorescent chemistries for real time –PCR. In *Real time PCR: an essential guide*. Ed. by Kirstin E., Logan J., Saunders N. Horizon Bioscience. U.K. ISBN: 0 -9545232 – 7 –X. 347 pg.
- Levin L., Papinutti L., Forchiassin F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin – modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94: 169 – 176.
- Li D., Alic M., Brown J.A., Gold M.H. 1995. Regulation of manganese peroxidase gene transcript by hydrogen peroxidase, chemical estrés, and molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 341-345.
- Lihme I. 1904. Preserved wood and process of preparing same. United States Patent N° 756, 173.
- Liu, W., and D.A. Saint. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:347-353.
- Livak K., Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2(\Delta\Delta CT)$ method. *Methods.* 25: 402 – 408.
- Lloyd J., Fogel J. 2001. Wood preservative concentrate. United States Patent N° US 6,896, 908 B2.
- Lundell T., Makela M., Hildèn K. 2010. Review. Lignin – modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of basic Microbiology.* 50: 5 – 20.
- Ma B., Mayfield M.B., Godfrey B.J., Gold M.H. 2004. Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Eucaryotic cell.* 3: 579 – 588.
- Manning M. 2008. Borate wood preservatives: the current landscape. Chapter 26. Development of comercial wood preservatives. Efficacy, environmental, and health issues. ACS Symposium Series 982. Ed.by Schultz, Militz, Freeman , Goodell and Nicholas.
- Manubens A., Avila M., Canessa P., Vicuña R. 2003. Differential regulation of genes encoding mangese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Current Genetics.* 43: 433 – 438.
- Marney D.C., Russell L.J. 2008. Combined Fire Retardant and Wood Preservative Treatments for Outdoor Wood Applications – A Review of the Literature. *Fire Technology* 44: 1-14.
- Marten N., Burke E., Hayden J., Straus D. 1994. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB J*, 8: 538 – 544.
- Martha de Souza C.C., Corrêa de Oliveira D., Soares Tenorio J. 2001. Characterization of used alkaline batteries powder and analysis of zinc recovery by acid leaching. *Journal of Power Sources* 103: 120 – 126.
- Martinez D., Larrondo L.F., Putnam N., Gelpke M.D.S., Huang K., Chapman J., Helfenbein K.G., Ramaiya P., Detter J.C., Larimer F., Coutinho P.M., Henrissat B., Berka R., Cullen D., Rokhsar D. 2004. Genome sequence of the lignocelluloses degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology.* 695-700.

- Martínez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutierrez A., del Río J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8: 195- 204.
- Mayfield M.B., Godfrey B.J., Gold M.H. 1994. Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the *basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 142: 231-235.
- Medhurst A., Harrison D., Read S., Campbell C., Robbins M., Pangalos M. 2000. The use of Taqman RT_ PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98: 9 – 20.
- Mehra R., Winge D. 1991. Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 45: 30 –40.
- Morohoshi N. 1991. Laccases of the ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. *American Chemical Society*. 207-223.
- Morse D., Carroll, Weberg L., Borgstrom M., Ranger-Moore J., Gillies R. 2005 Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 342 (1): 69-77
- Munir E., Hartori T., Shimada M. 2004. Profile of enzyme activity and growth of wood rotting fungi in metal ion containing media. Proceeding of the 5th International Wood science Symposium. ISPS – LIPI. Core University.
- Nazarenko I., Bhatnagar S., Hohman R. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA base don energy transfer. *Nucleic Acids Res* 25: 2516 – 2521.
- Ollikka P., Alhoniemi K., Leppänen V., Glumoff T., Rajola T., Suominen I. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4010-4016.
- Orlando c., Pinzani P., Pazzagli M. 1988. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 36: 255 – 269.
- Palmieri G., Cennamo G., Sanna G. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolorization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 36 :17– 24.
- Pease E.A., Andrawis A., Tien M. 1989. Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: primary structure deduced from cDNA sequence. *J.Biol.Chem.* 264: 13531-13535.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53- 63.
- Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pfaffl M. 2004. Chapter 3: Quantification strategies in real – time PCR. In: A-Z of quantitative PCR. Editor S.A. Bustin. International University Line. La Jolla. USA. Pg. 87-112.
- Pfaffl M. 2007. Chapter 3: Relative Quantification. In real time PCR. Editor T. Dorak. Pg. 63 – 82.
- Pointing S.B., Bucher V.V.C., Vrijmoed L.L.P. 2000. Dye decolorization by sub – tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 199 – 205.
- Prousek J. 2007. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 79 (12): 2325 – 2338.

- Rasmussen R. 2001. Quantification on the lightcycler. In: *Rapid Cycle Real-Time PCR* (Ed. By C.T. W.S: Meuer and K. Nakagawara) 21 – 34. Springer Press, Heidelberg.
- Reader U., Thompson W., Broda P. 1988. RFLP-based genetic map of *Phanerochaete chrysosporium* ME446: lignin peroxidase genes occur in clusters. *Mol. Microbiol.* 3: 911-918.
- Reiser J., Walther I., Fraelfel C., Fiechter A. 1993. Methods to investigate the expression of lignin peroxidase genes by the white-rot fungus *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2897-2903.
- Ririe K., Rasmussen R., Wittwer C. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245: 154 -160.
- Ritch T.G., Gold M.H. 1992. Characterization of a highly expressed lignin peroxidase-encoding gene from the basidiomycete *P. chrysosporium*. *Gene* 118: 73-80.
- Rodriguez Couto S., Modes D., Sanromán m. 2006. Optimum stability conditions of pH and temperatura for ligninase and manganese dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Application to in vitro decolorization of Poly –R 478 by MnP. *World J of Microbial and Biotechnol* 22: 607 -612.
- Rothschild N., Hadar Y., Dosoretz C. 1995. Ligninolytic System Formation by *P. chrysosporium* in Air. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1833-1838.
- Rothschild N., Levkowitz A., Hadar Y., Dosoretz C. 1999. Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 483-488.
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Rózycki H. 1992. Effect of heavy metals (Pb, Zn, Cu and Cd) on germination of conidia of *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Zent.bl. Mikrobiol.* 147: 261-269.
- Ruiz-Dueñas F., Martínez A.T. 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb. Biotech.* 2 (2): 164 -177.
- Ruiz-Dueñas F., Morales M., García E., Miki Y., Martínez M., Martínez A. 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycetes peroxidases. *Journal of Experimental Botany.* 60 (2): 441 – 452.
- Rutherford J., Bird A. 2004. Metal –responsive transcription factors that regulate iron, zin and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic Cell.* 3 : 1 –13.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saunders N. 2004. Cap 1: In introduction to real time PCR. In *Real time PCR: an essential guide.* Ed. by Kirstin E., Logan J., Saunders N. Horizon Bioscience. U.K. ISBN: 0 -9545232 – 7 –X. 347 pg.
- Sato S., Liu F., Koc H., Tien M. 2007. Expression analysis of extracellular proteins from grown on different liquid and solid substrates. *Microbiology.* 153: 3023 – 3033.
- Sayadi S., Ellouz R. 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *P. chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1098-1103.

- Schmittgen T., Zakrajsek B., Mills A., Gorn V., Singer M., Reed M. 2000. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real time methods. *Anal Biochem* 285: 194 – 204.
- Schützendübel A., Polle A. 2001. Plant responses to abiotic stress: heavy metal- induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Forsbotanik und Baumphysiologie*, Georg August Universität, Germany.
- Sing P., Junnarkar A. 1991. Behavioral and toxic profile of some essential trace metal salts in mice and rats. *Indian Journal of physiological pharmacology*. 23 (3): 153 – 159.
- Singer V., Paragas V., Larison K., Wells K., Fox C. Haugland R. 1994. Fluorescence based signal amplification technology. *Am Biotechnol Lab* 12: 55 – 56, 58.
- Singh D., Chen S. 2008. The white – rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin- degrading enzymes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 81: 399- 417.
- Singhal V., Rathore V. 2001. Effects of Zn²⁺ and Cu²⁺ on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in *Phanerochaete chrysosporium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17 : 235 – 240.
- Smyth H., Carpenter C., Weil C., Pozzani U., Striegel J., nycum J. 1969. Range finding toxicity data. List VII American Industrial Hygiene Association Journal 30: 470 –476.
- Spadaro J.T., Gold M. H., Renganathan V. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2397 - 2401.
- Srinivasan C., D'Souza T.M., Boominathan K., Reddy C.A. 1995. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *P. chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4274 -4277.
- Sundaramoorthy M., Kishi K., Gold M., Poulos T. 1994. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2,06- Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 268 (52):32759 - 32767.
- Sundaramoorthy M., Heather L., Gold M., Poulos T. 2005. High resolution crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes. *Biochemistry*. 44 :6463 - 6470
- Sundaramoorthy M., Gold M., Poulos T. 2010. Ultrahigh (0,93 Å) resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: implications for the catalytic mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 104, 683 – 690.
- Stewart P., Cullen D. 1999. Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bact.* 181: 3427 - 3432.
- Stewart P., Kersten P., Vandem Wymelenberg A., Gaskell J., Cullen D. 1992. Lignin peroxidase gene family of *P. chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. *J. Bacteriol.* 174: 5036 - 5042.
- Stuardo M., Vásquez M., Vicuña R., González B. 2004. Molecular approach for analysis of model fungal genes encoding ligninolytic peroxidases in wood – decaying soil systems. *Letters in Applied Microbiol* 38: 43 – 49.
- Stuardo M., Larrondo L.F., Vásquez M., Vicuña R., González B. 2005. Incomplete processing of peroxidase transcripts in the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology* 242: 37 – 44.

- Szabo A., Peron C., Karaca M., Pereard L. 2004. Statistical modeling for selecting housekeeper gene. *Genome Biology* 5: R59.
- Takehiro A., Takahisa T., Isao A. 1999. Effect of heavy metals on the growth of basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Conservation Engineering*. 28 (4): 271 – 275.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596 – 1599.
- Thiele DJ. 1992. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 20:1183–1191.
- Tien M., Kirk K. 1988. Lignin preoxidase of *P. chrysosporium*. *Methods Enzimol*. 161: 238 – 249.
- Tien M, Kirk K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *P. chrysosporium*. *Science* 221: 661 - 663.
- Tomsovy M., Popelarova P., Baldrian P. 2009. Production and regulation of lignocelluloses degrading enzymes of *Poria* – like wood inhabiting Basidiomycetes. *Folia Microbiol*. 54: 74 – 80.
- Tripathi S., Bagga J.K., Jain V.K. 2005. Preliminary studies on ZiBOC –A potential eco- friendly wood preservative. Doc. IRG W/P 05- 30372. *The International Research Group on Wood Preservation*.
- Turpeinen R. 2002. Interactions between metals, microbes and plants. Biorremediation of arsenic and lead contaminated soils. Department of Ecological and Environmental Sciences, University of Helsinki.
- Vanden Wymelenberg A., Gaskell J., Mozuch M., Kersten P., Sabat G., Martinez D., Cullen D. 2009. Transcriptome and Secretome Analyses of *Phanerochaete chrysosporium* Reveal Complex Patterns of Gene Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 12 , p. 4058–4068.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real time quantitative PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 0034-1 – 0034- 11.
- Vatistas N., Bartolozzi M., Arras S. 2001. The dismantling of the spent alkaline zinc manganese dioxide batteries and the recovery of the zinc from the anodic material. *Journal of Power Sources* 101: 182 – 187.
- Vyas B.R.M., Volc J., Sasek V. 1994. Ligninolytic Enzymes of Selected White Rot Fungi Cultivated on Straw. *Folia Microbiol*. 39: 235-240.
- Vyas B.R.M., Molitoris H.P. 1995. Involvement of an Extracellular H₂O₂-Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot Fungus *Pleorotus ostreatus* in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environ. Microbiol*. 61: 3919-3927.
- Yonni F., Fasoli H.J., Roca E., Feijoo G. 2002. Effect of heavy metals on the degradative activity by wood- rotting fungi. *Environmental Contamination and Toxicology* 68: 752-759.
- Yoshida M., Igarashi K., Kawai R., Aida K., Samejima M. 2004. Differential transcription of b-glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* 235: 177–182.
- Wang P., Hu X., Cook S., Begonia M., Lee K.S., Hwang H.M. 2008. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 24: 2205- 2212.
- Wang J., Chen C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotech Advances*. 27: 195 – 226.

- Wariishi H, Dunford HB, Macdonald ID, Gold MH. 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *Journal Biological Chemistry* 264:3335–3340
- Wariishi H, Valli K, Gold MH 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal Biological Chemistry* 26:23688–23695.
- Whitcombe D., Brownie J., Gillard H., McKechine D., Theaker J., Newton C., Little S. 1998. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real time, single – tube genotyping. *Clin Chem* 44: 918 – 923.
- Wilcox W. 1968. Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- Wilhelm J., Pinguod A. 2003. Real – Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* . 4: 1120 – 1128.
- Wittwer C., Fillmore G., Hillyard D. 1989. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res* 31: e 56.
- Wittwer C., Herrmann M., Moss A., Rasmussen R. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130 – 131, 134 – 138.
- Wong M., Medrano J. 2005. Real- time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 39 (1): 1 – 11.
- World health Organization. 2001. Environmental health criteria. Geneva.
- Zhu H., Dean R. 1999. A novel method for increasing the transformation efficiency of *Escherechia coli* - Application for bacterial artificial chromosome library construction. *Nucleic Acids Res*, 27, 910 – 911.

7 – MATERIALES Y MÉTODOS

6 - MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 - Cepas utilizadas

Las cepas empleadas pertenecen a la Colección de Hongos de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química: *Phanerochaete chrysosporium* (1556, DZM) y *Punctularia atropurpurascens* (H2126).

Para los ensayos sobre probetas de madera se añadieron: *Gloeophyllum trabeum* (H 2130 CCMFQ) y *Coriolus versicolor* (H 2140 CCMFQ) ambas de la Colección de la Sección Micología de la Facultad de Ciencias, UDELAR.

Para la preparación de células competentes se utilizó *E coli*, TOP10.

6.2 - a) Determinación del efecto de los metales sobre la germinación de conidios

Sobre un portaobjetos estéril, se colocó una fina capa de malta – agar, suplementado con las soluciones de los sulfatos puros a distintas concentraciones metálicas de acuerdo a: ZnSO₄: 0,08, 0,16, 0,25, 0,33, 0,66, 1, 1,5 y 2 mM en Zn; MnSO₄: 0,04, 0,12, 0,25, 0,5, 0,8, 1, 1,5 y 2 mM en Mn; ZnSO₄- MnSO₄: 0,08-0,04, 0,16- 0,12, 0,25- 0,12, 0,33- 0,25, 0,5- 0,25, 0,66- 0,5, 1- 0,5, 1,5- 0,7 y 2-1 mM en Zn y Mn respectivamente. Una vez que solidificó el medio se inoculó con una gota de suspensión de conidios de cada basidiomycete (Guiraud & Galzy, 1980). Los portaobjetos se cultivaron a 28°C dentro de placas de Petri y se observó al microscopio de contraste de fases (40x) hasta la germinación de los conidios. Luego se observó por 48 horas más para conocer si se producía algún cambio en los cultivos. Se tomaron fotografías a distintos tiempos de cultivo.

b) Determinación del efecto de los metales sobre el crecimiento en placa

Condiciones de cultivo

Placas de Petri (8,5 cm de diámetro interno) con agar – malta previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos, se inocularon con discos de 5 mm de diámetro cortados con sacabocado de micelio en crecimiento obtenido del borde de las placas.

Los medios fueron suplementados con las soluciones en estudio en cuatro series de ensayos a distintas concentraciones finales en los metales, de acuerdo al siguiente detalle:

1 - Medio de cultivo suplementado con solución estándar de ZnSO₄ (2.5M); las concentraciones finales en Zn ensayadas fueron: 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM.

2 – Medio de cultivo suplementado con solución estándar de MnSO₄(1.25M); las concentraciones en Mn ensayadas fueron: 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM.

3 - Medio de cultivo suplementado con una mezcla de solución estándar de ZnSO₄ (2.5M) y solución estándar de MnSO₄ (1.25M); las concentraciones en Zn ensayadas fueron: 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 25 mM en Mn).

4 - Medio de cultivo suplementado con la solución obtenida a partir del proceso de reciclado de pilas (30 g/l en Zn y 15 g/l en Mn); las concentraciones finales en Zn en los medios fueron: 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM; en Mn: 0,25 mM, 0.5 mM, 1mM, 2.5 mM, y 5 mM.

Los hongos fueron cultivados a 28°C por 22 días.

Reactivos químicos

Extracto de malta y agar son de Oxoid Ltd. Los sulfatos de Zn y Mn son de Sigma Chemical Co.

Evaluación de los resultados

El crecimiento micelial para cada placa se evaluó a través del cálculo de las áreas de la superficie de las colonias (en mm²) y las velocidades iniciales de crecimiento al día 9, a las distintas concentraciones de metal (Hatvani *et al.*, 2003). Se determinó la CIM (concentración inhibitoria mínima) de cada solución (Borokhov *et al.*, 2000).

Lo significativo de las diferencias entre la medida de las colonias se estimó usando el test de Mann-Whitney con un límite de significancia de $P < 0.05$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

c) Determinación del efecto de los metales sobre el crecimiento de los hongos en madera

c.1) Ensayos de minibloques

Basados en el *miniaturised wood – block test* (Bravery, 1978). Se utilizaron probetas de *Pinus taeda* de dimensiones (50 ± 0,5) mm x (25 ± 0,5) mm x (15 ± 0,5) mm. Se secaron 200 probetas por ensayo en horno a (103 ± 2)°C por 18 horas. Luego se impregnaron con las soluciones en estudio (sulfatos puros y la solución proveniente del proceso de reciclado), a distintas concentraciones por el método Bethell: ½ hora de vacío inicial a -0,6 bar; 1 hora de presión a 12 bar y ½ hora de vacío final a -0,6 bar, en un cilindro de impregnación de laboratorio, de 1m de largo y 20 cm de diámetro.

Las probetas se acondicionaron a 60°C y 65% HR por 48 horas. Luego se esterilizaron con corriente de vapor en autoclave, de acuerdo al ciclo: 20 minutos de vapor- 24 horas a temperatura ambiente - 10 minutos de vapor en autoclave. Finalmente se colocaron 2 probetas tratadas a igual retención y una probeta control, por placa de Petri de 85 mm de diámetro con agar (1,5%) - malta (2%) previamente inoculado con los hongos correspondientes, cuyo micelio cubría completamente la superficie de la placa.

Se cultivaron a (28 ± 2) °C y (70 ± 5) % humedad relativa, por 4 semanas. Se realizaron 6 réplicas de cada tratamiento y de los controles.

En el ensayo participaron aquellas probetas cuya densidad (al 12% de contenido de humedad) no difirió en menos de 10% del valor medio de densidad al inicio del ensayo y cuya masa de preservante retenida no se apartó más de 20% del valor medio para cada concentración de solución

El ataque fúngico fue evaluado por la pérdida de masa media (%), respecto al peso seco antes y después de la exposición a los hongos.

Se tomaron finas muestras de madera con deterioro para observar al microscopio óptico.

c.2) Ensayos de acuerdo a norma

El ensayo realizado se basó en la norma EN113:1996: "Protectores para madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomicetos destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos" (AENOR, 1996).

Se emplearon probetas de *Eucalyptus grandis* (albura) y *Pinus taeda* cuyas dimensiones de acuerdo a la norma fueron: $(50 \pm 0,5)$ mm x $(25 \pm 0,5)$ mm x $(15 \pm 0,5)$ mm. Fueron secadas en horno a $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ por 18 horas; se trabajó con 200 probetas de cada especie en cada ensayo. Luego se impregnaron a cuatro diluciones de la solución proveniente del ensayo de pilas, por el método Bethell en un cilindro de impregnación de acuerdo al ciclo: ½ hora de vacío inicial a -0,6 bar; 1 hora de presión a 12 bar y ½ hora de vacío final a -0,6 bar.

Se utilizan los dos cilindros disponibles:

A - De 1m de largo y 20 cm de diámetro, que alcanza 12 atm de presión (Wood Treating Chemicals Co.Saint Louis MO.USA), perteneciente a UTE. Se descompuso durante el ensayo.

B - De 90 cm de largo y 20 cm de diámetro, que alcanza 12 atm de presión; de diseño propio y construcción nacional, perteneciente a GESTEC de Facultad de Química.

Se ensayaron cuatro concentraciones de la solución obtenida a partir del proceso de reciclado, como indica la norma: 0; 0,8; 1,5 y 3 % en zinc.

Se incluyeron en el ensayo aquellas probetas secas (hasta peso constante) cuya densidad difirió menos de 10% del valor medio de densidad y cuya masa de preservante retenida luego de impregnadas (masa de preservante retenido/unidad de volumen de madera) no se apartó más de 20% del valor medio para cada concentración de solución.

Se trabajó con dos valores de retención para la serie de 1.5 % en Zn, debido a una falla mecánica en la bomba de presión del cilindro A, que obligó a cambiar el proceso de impregnación. Se hizo un vacío inicial de -0,6 bar, luego se llenó el cilindro sin agregar presión, se mantuvo durante 2 horas y se retiró la solución; por esta razón, las retenciones logradas para esta concentración no son las esperadas.

Las probetas se esterilizaron por el ciclo: 20 minutos de corriente de vapor- 24 horas a temperatura ambiente- 10 minutos de vapor en autoclave. Los frascos de cultivo de 650 ml de capacidad se armaron de acuerdo a la norma: para cada concentración de solución y para cada hongo ensayado se colocó una probeta impregnada y una sin impregnar (control) por frasco. Para el control de virulencia de los microorganismos se colocaron probetas no tratadas en medios inoculados con los distintos hongos en frascos y para el cálculo del valor de corrección (cambios por factores abióticos que afecten la madera durante el tiempo de cultivo) se colocaron probetas tratadas sin inocular en frascos.

Se cultivó por 16 semanas a $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ y (70 ± 5) % humedad relativa.

La eficacia de la solución preservante se determinó a través de las pérdidas de peso corregidas de las probetas impregnadas luego de 16 semanas de exposición a los hongos destructores de la madera. La norma indica los porcentajes de pérdidas de peso de aceptación o rechazo del resultado.

Los hongos “obligatorios” especificados en la norma validan el resultado: *Gloeophyllum trabeum* (podredumbre marrón de la madera) y *Coriolus versicolor* (podredumbre blanca de la madera). No se pudo incluir *Coniophora puteana* que es el hongo obligatorio para todo tipo de preservante, por no estar disponible en las colecciones consultadas.

c.3) Ensayo de campo

El ensayo se instaló siguiendo lo prescrito en la norma EN 252. Se usaron probetas de (500 ± 1) mm x $50 \pm 0,3$ mm x $(25 \pm 0,3)$ mm. Se seleccionaron 91 con densidades dentro del rango de la media $\pm 15\%$. Se secaron hasta un contenido de humedad de $14\% \pm 2\%$. 60 probetas se impregnaron en un autoclave de laboratorio de 50 litros por el método Bethell (30 min.de vacío inicial, 60min. A 10 kg.m^{-2} depresión, 30min.de vacío final) con la solución en estudio a cuatro concentraciones: 0,8%, 1,5%, 3% y 6% de Zn.

De las 20 probetas de cada concentración, 5 quedaron solo con la solución, 15 fueron tratadas con bórax al 2%, 5 por pincelado, 5 por inmersión y 5 por vacío presión vacío. 10 probetas se usaron como testigos sin tratamiento. El protector alternativo de referencia fue CCA, 10 probetas fueron tratadas a una retención de 8 kg.m^{-3} y 11 probetas a una retención de 12 kg.m^{-3} .

Los códigos de los tratamientos se encuentran en la tabla 22.

A1	0,8%Zn
A2	0,8%Zn+B Pinc
A3	0,8% Zn + B vpv
B1	1,5% Zn
B2	1,5%Zn + B pinc.
B3	1,5%Zn + B vpv
C1	3%Zn
C2	3%Zn + B pinc
C3	3%Zn + B vpv
D1	6%Zn
D2	6% Zn + B pinc.
D3	6%Zn + B vpv
E	Blanco
F	CCA 8 kg/m ³
G	CCA 12 kg/m ³

Tabla 22: Códigos empleados de identificación de los tratamientos realizados a las probetas.

Las probetas se colocaron en el campo al azar, enterradas 25 cm en tres filas de 30 probetas separadas 50 cm. En las inspecciones de campo se evaluó deterioro, dureza superficial y resistencia. Se tomaron

finas muestras de madera para observar al microscopio óptico. La tabla 23 muestra la escala de calificación del deterioro de probetas empleada en las evaluaciones.

CLASIFICACIÓN

0	Sin ataque, madera sana
1	Ataque ligero
2	Ataque moderado
3	Ataque severo
4	Ruptura

Tabla 23: escala de calificación del deterioro de probetas.

6.3) Determinación del efecto sobre la actividad enzimática

a) Degradación de colorantes orgánicos

Condiciones de cultivo

Idem 6.2) a).

Al medio de cultivo se adicionaron los colorantes poliméricos: Remazol Brilliant Blue R (0.02% w/w), o Poly R – 478 (0.02% w/w), en cada una de las series de soluciones ensayadas. Medio sin colorante se empleó como control.

Reactivos químicos

El extracto de malta y el ágar son de Oxoid Ltd. Los sulfatos de Zn y Mn, el Remazol Brilliant Blue R (catalog no R- 8001) y el Poly R –478 (catalog no P - 1900), son de Sigma Chemical Co.

Evaluación de los resultados

Los halos de decoloración de cada placa fueron evaluados a través del cálculo del área de las zonas de decoloración en mm². Se determinaron las MCID, mínima concentración que inhibe la decoloración (Borokhov *et al.*, 2000).

Lo significativo de las diferencias entre la medida los halos de las colonias se estima usando el test de Mann- Whitney con un límite de significancia de $P < 0.05$.

b) Determinaciones espectrofotométricas

Condiciones de cultivo

Los ensayos se realizaron en Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de CLB para *P. chrysosporium* y agua de malta (1.25%) para *P. atropurpurascens*, inoculados con suspensiones de esporas del hongo correspondiente a una concentración aproximada de 10^7 conidios/ ml, en Tween 80 diluido.

Se realizaron dos tipos de ensayos: uno determinó la actividad enzimática a partir de las enzimas preformadas a las que se agregó la solución metálica correspondiente a distintas concentraciones; en tanto el otro determinó la actividad enzimática en el sobrenadante, cuando se cultivaron los hongos en

presencia de los metales a distintas concentraciones. En ambos casos las concentraciones finales de los metales fueron las siguientes:

1 – Con la solución estándar de $ZnSO_4$ (2.5M), las concentraciones finales en Zn en los medios fueron: 0.25 mM; 0.5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 4 mM; y 12 mM. en Zn.

2 - Con la solución estándar de $MnSO_4$ (1.25M) las concentraciones finales en Mn en los medios fueron: 0.25 mM; 0.5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 4 mM; y 12 mM. en Mn.

3 - Con la mezcla de soluciones estándar de $ZnSO_4$ (2.5M) y solución estándar de $MnSO_4$ (1.25M), las concentraciones finales en Zn en los medios fueron: 0.5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 4 mM; y 12 mM. en Zn; acompañado de: 0.25 mM; 0.5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 4 mM; y 6 mM. en Mn.

4 - Con la medio de cultivo la solución obtenida a partir del proceso de reciclado de pilas (30 g/l en Zn y 15 g/l en Mn), las concentraciones finales en Zn en los medios fueron: 1mM; 5mM; y 10mM en Zn; 0.5mM, 2.5mM, y 5mM.

Se cultivaron a 28°C por 22 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los ensayos sobre enzimas preformadas se realizaron sobre extractos enzimáticos correspondientes al 7^{mo} día de cultivo para *P. chrysosporium* y al 10^{mo} día de cultivo para *P.atropurpurascens*, que corresponden al tiempo de cultivo donde se observó la máxima expresión de *mnp*.

Las actividades ligninolíticas de MnP, LiP y Lac fueron determinadas según las siguientes referencias:

MANGANESO PEROXIDASA (Castillo *et al.*, 1994)

El ensayo se basa en el acoplamiento oxidativo de 3 – metil-2 – benzotiazolinona hidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB). En la presencia de $MnSO_4$, H_2O_2 , MBTH y DMAB la manganeso peroxidasa (MnP) cataliza la formación de un compuesto púrpura el cual tiene un amplio rango de absorción entre 575 y 600 nm, con un pico a 590 nm. La actividad MnP fue determinada en un medio de reacción (3 ml) conteniendo:

1300 μ l de buffer succinato – lactato 0.1 M pH 4.5

300 μ l de DMAB 6.6 mM

100 μ l de MBTH 1.4 mM

30 μ l de $MnSO_4$ 20 mM

300 μ l de muestra

10 μ l de H_2O_2

Se midió el incremento de absorbancia a 590 nm.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 μ mol de producto en un minuto

LIGNINO PEROXIDASA (Tien y Kirk, 1988)

El ensayo mide la oxidación dependiente de peróxido de alcohol veratrílico a veratraldehído. El alcohol no exhibe absorbancia a 310 nm mientras que el aldehído absorbe fuertemente. La actividad lignino peroxidasa (LiP) fue determinada en un medio de reacción (3 ml) conteniendo:

1400 μ l de buffer de tartrato de sodio 0.1 M pH 3.0

200 μ l de alcohol veratrílico 2 mM

280 μ l de muestra

120 μ l de H₂O₂ 2.5 mM

Se midió el incremento de absorbancia a 310 nm.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de alcohol veratrílico en un minuto

LACASA (Galiano *et al.*, 1991)

El ensayo se basa en el incremento de absorbancia debido a la formación de tetrametoxi- azo-bis- metilenquinona a partir de la oxidación de la siringildazina. La actividad lacasa fue determinada en un medio de reacción (3 ml) conteniendo:

2690 μ l de buffer fosfato 100 mM pH 6.0

300 μ l de muestra

10 μ l de siringildazina (1.6 mg/ ml metanol)

La formación de quinonona fue monitoreada a 526 nm. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produjo un Δ abs /min = 1 a λ = 526 nm.

c) Determinación del efecto de los metales sobre la regulación de la expresión de los *mnps*.**c.1) Obtención de cultivo monospórico**

Se hizo una suspensión de esporas en 1 ml de Tween 80 (0,01%) con punta estéril a partir de un cultivo en medio sólido. Se homogeneizó en vortex durante 1- 2 minutos y se hizo recuento de esporas en cámara de Neubauer. Se sembraron dos diluciones correspondientes a 1 – 10 esporas/100 mL. Se consideró cultivo aislado aquel cuya placa tenga una única colonia.

c.2) Siembra por picadura en medio sólido

Se tocó con una punta (o escarbadientes) estéril la colonia de interés en zona con esporas. Se colocó el escarbadientes con esporas hacia arriba. Se tocó la placa con medio sólido a sembrar invertida. Se cuidó de no llegar al fondo de la placa. Se tapó la placa con cuidado de no golpear y se incubó a tiempo y temperatura según el organismo. *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium* se incuban a 28 °C por 8 días.

c.3) Siembra por suspensión esporas en caldos

El inóculo se preparó retirando las esporas de las placas en 10 días de cultivo a 30°C en Tween 80 (0,01%) y se ajustó a una concentración de 10^7 esporas/ml. 1 ml de este inóculo se agregó a 50 ml de cada uno de los siguientes medios en Erlenmeyer de 250 ml: (i) RB (medio rico); (ii) MP (extracto de malta y peptona); (iii) MP-Mn (MP suplementado con Mn^{2+}); (iv) CLB (RB limitado en carbono); (v) NLB (RB limitado en nitrógeno) (ver anexo 1). Todos los cultivos se retiraron de la estufa en la fase estacionaria, día 8.

Condiciones de cultivo

Para optimizar la expresión de las *mmps* se realizaron experiencias en diversas condiciones: RB, MP, MP- Mn^{2+} , CLB, NLB, cultivadas a 28°C y 37°C, en cultivos estacionarios o a 150 rpm de agitación.

c.4) Preparación de las muestras para aislamiento de ácidos nucleicos

Transcurrido el tiempo de cultivo, el micelio se filtró a través de un blutex estéril, se enjuagó con agua destilada estéril, se secó y se colocó en papel de aluminio rotulado. Se congeló en N_2 líquido y se guardó a -70 °C hasta su uso. Previo a la extracción de los ácidos nucleicos, se trituró el micelio congelado en mortero con N_2 líquido hasta formar un polvo fino. Se pasó a un eppendorf rotulado y se extrajo de ADN, o el ARN o se guardó a -70°C.

c.5) Extracción de ADN genómico

Se empleó el método fenol-cloroformo: a 50-100 mg de micelio pulverizado (en eppendorf de c.4) se agregaron 900 μ l de buffer de extracción (0,2 M Tris HCl pH 7,5, 1% de SDS y 1 mM de EDTA), se vortexeó y se incubó 5-10 minutos en hielo. Se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), se vortexeó y se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en un eppendorf rotulado y se agregó 1 volumen de cloroformo: isoamílico (24:1), se vortexeó y se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm y se recuperó la fase acuosa. La precipitación se realizó con 1/10 volumen de NaAc 3M pH 5,2 y 2 volúmenes de EtOH 95% durante 20 minutos en hielo. Se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, se lavó el pellet con EtOH 70%, se resuspendió en 50-100 μ l de TE-ARNasa (1 ml TE, 10mM Tris-HCl pH 6 y 1 mM de EDTA pH 8) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se observó en gel de agarosa 0,8%.

c.6) Electroforesis en geles de agarosa

El ADN se analiza por electroforesis en gel de agarosa: 0.8 % ó 2,5 % (según tamaño del producto) en TBE 0.5 x con 5 μ g/ml de bromuro de etidio (Anexo I), a temperatura ambiente y voltajes entre 50 y 100 v. La preparación del gel y los buffers se hace de acuerdo a Sambrook *et al.*, 1989. Se

corre en paralelo un marcador de peso molecular para determinar los tamaños de los fragmentos obtenidos; esta comparación se usa para cuantificar el ADN.

El ADN se visualiza iluminando el gel con luz UV en el transiluminador. Se fotografía con una cámara digital Kodak DC120 (Kodak Digital Science) y se convierte a archivo de imagen mediante el Sistema de Análisis y Documentación de Electroforesis 120 de Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester. NY, USA).

c.7) Cuantificación de ADN/ ARN

Se prepararon diluciones del ADN/ARN a cuantificar en agua mQ (2/100)(para ARN, se empleó agua DEPC). Se determinó la absorbancia del blanco (agua mQ), y luego las absorbancias de la muestra a 260 y 280 nm. Si las medidas de absorbancia, se salieron del rango de linealidad 0,1 – 1, la muestra se concentró o se diluyó según corresponda. Se calculó la concentración (en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de ácidos nucleicos según la relación $1\text{DO} \approx 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ para ADN y $1\text{DO} \approx 38 \mu\text{g}/\text{mL}$ para ARN. La pureza de la muestra se determinó por la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,6$.

c.8) Amplificación por PCR convencional

Se utilizó *Taq* polimerasa (*Taq* DNA Polymerase), los reactivos y los dNTP (10 mM) todos de Invitrogen para la amplificación de ADN. Se realizaron en un volumen final 25 μL . Equipo a emplear: Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400.

c.9) Aislamiento del ARN

La extracción de ARN total se realizó según el protocolo recomendado por el fabricante del reactivo TriZol (Invitrogen) con modificaciones. A 50-100 mg de micelio pulverizado se agregó 1 ml de TRizol (Invitrogen), se mezcló y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó por inversión 15 segundos y se incubó 2 - 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos a 2 – 8 °C. Se transfirió la fase acuosa a eppendorf de 1,5 ml, se agregó 0,5 ml de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm a 2 – 8 °C para remover el sobrenadante posteriormente. Se lavó el ARN con 1 ml de EtOH 75% se vortexó y se centrifugó a 6 500 rpm durante 5 minutos a 2 – 8 °C. El pellet de ARN obtenido se secó brevemente en hielo y se disolvió en 50 – 100 μl de agua DEPC (200 μl de solución comercial DEPC (USB™) en 1L de agua destilada ON en campana, luego se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos), se agitó a mano y se dejó en hielo. El ARN se almacenó a – 70°C.

c.10) DNasa y RT-PCR

Se realizó de acuerdo a especificaciones del fabricante de la ADNasa y la transcriptasa reversa (Invitrogen) con modificaciones. Primero se eliminó el ADN presente, en un volumen total de 9,4 µl de reacción, 1 µl de buffer 10x, 0,4 µl de DNasa (Invitrogen), 1 µg de ARN y agua mQ. La enzima actuó 17 minutos hasta la preinactivación con 1 µl de EDTA. Luego se inactivó a 65°C por 10 minutos. La transcripción reversa (RT-PCR) se realizó en un volumen total de 20,4 µl de reacción: a los 10,4 µl del tratamiento con ADNasa se agregaron 4 µl de buffer 5x, 2 µL de dTT (Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10 mM cada una), 1 µL de random primers (0,2 µg/µl), (Qiagen), 1 µl de inhibidor de ARNasa y 1 µL de MMLV (200 U / µL) (Invitrogen). Programa usado para la reacción: 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C (Termociclador Labnet Multi Gene II). El ADNc obtenido se diluyó al cuarto y se almacenó a -20°C.

c.11) Amplificaciones por PCR en tiempo real

La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó empleando QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2x) (Quiagen) en un volumen final de reacción de 10 µl conteniendo 0,5 µL de cada oligonucleótido (6 µM) y 2 µL de molde ya sea ADNg (5ng/µL) o ADNc (1/4). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Corbett Rotor – Gene TM 6000, con el siguiente programa: (i) desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos, (ii) 30 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización) y un minuto a 59°C (hibridación - extensión). Las reacciones se realizaron por duplicado o triplicado según qué se ensaya.

Las amplificaciones se realizaron de acuerdo al siguiente programa: i) desnaturalización a 95°C por 15 minutos, ii) 35 ciclos que inician con una desnaturalización a 94°C por 15 segundos, luego hibridación y elongación se hacen en un único paso a 59°C por 60 segundos.

c.12) Oligonucleótidos y condiciones de amplificaciones

P. chrysosporium

Se diseñaron oligonucleótidos para cuantificar las *mnps* y la *gpd*:

	SECUENCIA	AMPLICÓN	T _m (VNTI)	T _m (fórmula)	%(GC)	Dimeros Horquillas
Phgpd_qF1	TACCACCGCTACCCAGAAGA	90	52,2	62	48,6	2 con dG>0
Phgpd_qR1	GACGAGGGGATGATGTTGTT		51	60	46,7	
Phmnp1_qF	GAAGCCCGCGACTGG	107	49,9	52	73,3	2 con dG>0
Phmnp1_qR	CCGGCTGGGTAGTCAGAGT		50,3	56	63,2	
Phmnp2_qF	ACCATCCCCGCAGTTGAG	134	52,9	54	61,1	2 con dG>0
Phmnp2_qR	CGAGCAACGGTGTGTGAA		50,7	56	55,6	
Phmnp3_qF	CAGGACAGCGTGACGTCTG	70	53	60	66,7	dG<0
Phmnp3_qR	AGACCACCTCAAACGGGCT		53,4	60	57,9	

Cálculo de T_m (°C) = 2 (A + T) + 4 (G + C)

Tabla 6.1: Oligonucleótidos para cuantificar los genes *mnps* y *gpd*.

P. atropurpurascens

Oligonucleótidos diseñados para secuenciación parcial de genes *gpd* y *mnp*:

	SECUENCIA	AMPLICIÓN	T _m (VNTI)	T _m (fórmula)	%(GC)	Dímeros Horquillas	Degeneraciones
PuDeg_gpdF	GGTCGYATYGGCCGYATYGT	750	59,3	60 - 68	60	1 dim dG -4	16
PuDeg_gpdR	ATRACCTTKCCGACRCCTT		55,1	58 - 64	52,5	0	8
mnpPunct_degF1	CCGTCTYACYTTCCACGAYGC	795		62-64-66	59,5	0	8
mnpPunct_degR1	ACTGSAGVCGCAKCTCGCC			62-64-66	66,7	0	12

Tabla 6.2: Oligonucleótidos degenerados para *P.atropurpurascens* utilizados en la amplificación de genes *mnp*s y *gpd*.

R: (A / G); Y: (C / T); K: (G / T) S: (G / C)

Oligonucleótidos diseñados para la cuantificación relativa de los genes *mnp* y *gpd*:

	AMPLICIÓN	T _m (VNTI)	T _m (fórmula)	%(GC)	Dímeros Horquillas
mnp_A_f	CTTCGAGGTCATCTCCCTCCT	82	53,8	66	10, 2dG<0
mnp_A_r	GAAGGGAGCGGCGTCGA		57,3	58	1, dG<0
mnp_B_f	GGACAGCGGTGCAAGATCC	88	51,8	62	dG>0
mnp_B_r	CGAGTGAGAGGCAAGGAGAG		51,5	64	dG>0
mnp_D_f	CCTCGACTTTTTCCTTGGTC	92	50,5	50	1, dG<0
mnp_D_r	AGGATGGAGTCCACAGTGTC		48,1	62	1, dG<0
mnp_F_f	CATCGACGACTCCGTCAAC	83	50,9	60	3, dG<0
mnp_F_r	CTGCGAACTGAACAAGATCG		50,8	60	dG>0
gpd_f	CGCTGAGTACATCGTCGAGTC	153	52,4	66	1, dG<0
gpd_r	CGGAGATGATGACCTTCTGG		53,5	64	dG>0

Tabla 6.3 : Oligonucleótidos para la cuantificación relativa de las *mnp*s

c.13) Clonado y secuenciación de amplicones

c.13.1) Purificación de bandas obtenidas y clonado del vector con el fragmento amplificado

Las reacciones de PCR se migraron en gel de agarosa (en TBE 0,5X)(ver Anexo 1); la banda del ADN correspondiente al fragmento de interés se purificó y se cortó al UV. Los trozos de las bandas se colocaron en minicolumnas Wisard (Promega) y se centrifugaron 10 min a 4°C 13 000 rpm. (Opcional: Extracción fenol: cloroformo: isoamílico, centrifugar 5 min a TA 12Krpm. Extracción cloroformo:isoamílico, 2min a TA 12Krpm). El ADN se precipitó con 2 volúmenes de EtOH 96%,1/10 volúmenes de NaAc, por toda la noche a -20°C. Se centrifugó 15 min a 4°C 13 000 rpm, se lavó con 1 volumen de EtOH 70% y se centrifugó 15 min a 4°C 13 000 rpm. El pellet se secó al aire y se resuspendió en un 10 – 20 µL de H₂O mQ. El fragmento amplificado se clonó en el vector de clonación pCR 2.1 (Invitrogen) (Anexo 1) siguiendo las especificaciones del fabricante.

c.13.2) Precipitación con tRNA

La mezcla de precipitación se realizó con 5 µL del producto de ligación, 5 µL de ARN-t (0,2 µg/µL) (Invotrogen), 10 µL de H₂O mQ y 50 µL de EtOH absoluto. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se dejó secar y se resuspendió en 2 µl de H₂O mQ (Zhu & Dean, 1999).

c.13.3) Preparación de células competentes

Se trabajó con la cepa TOP 10 de *E. coli*. La preparación de células electrocompetentes se realizó luego de incubar las células en 3 mL de LB toda la noche (precultivo). Con 1 mL de precultivo se inocularon 250 mL de LB y se incubaron a 37 °C a 300 rpm donde se dejaron crecer las células hasta obtener una OD 600 entre 0,5 y 0,7. Posteriormente se transfirió el cultivo a tubos de centrifuga de 50 mL y se dejó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y 4000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante para resuspender en 1 volumen de glicerol 10%. Se juntaron las células en dos tubos, se centrifugaron en las mismas condiciones y se resuspendió en ½ volumen de glicerol 10%. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1/25 volumen de glicerol 10%. Posteriormente se juntaron las células en un tubo y se resuspendió en 1 mL de glicerol 10%. Se alicuotaron 50 µL en eppendorf y se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a – 70°C. La evaluación de las células competentes se realizó mediante electroporación con 10 pg de plásmido pUC19, se debía obtener una eficiencia de transformación de 10⁸ transformantes por µg de vector electroporado.

c.13.4) Transformación de células competentes

La transformación de las células preparadas con las mezclas de ligación, se realizó en un electroporador: Micropulser Electroporation Apparatus (Catalog number 165-2100) de BIO –RAD. Se descongelaron las células competentes en hielo y se agregaron a la ligación precipitada con ARN-t. Se transfirió a la celda (0,2 cm) se electroporó (modo Ec2) y se agregó 1 mL de SOC. Los parámetros del pulso deben ser de aproximadamente 5 milisegundos y entre 2,5 y 3 KV. La mezcla de transformación se incubó con agitación durante una hora a 37 °C. Se plaqueó en medio selectivo (LB más ampicilina, más X- gal e IPTG) y un blanco (sin antibiótico), se incubaron a 37 °C no más de 20 horas.

c.13. 5) Identificación y análisis de recombinantes

De la secuencia del plásmido pCR 2.1, tres de los genes que actúan como marcadores de selección permitieron identificar las bacterias con plásmido recombinante. Dichos genes son el gen amp^R de resistencia al antibiótico ampicilina, el gen kana^R de resistencia al antibiótico kanamicina y el gen lacZα, que codifica a la enzima β – galactosidasa que degrada lactosa y otros β – galactósidos como X-gal. El IPTG es el inductor, que permite la producción de β – galactosidasa. El inserto de ADN foráneo correspondiente a cada fragmento en estudio, interrumpe el gen lacZα en el plásmido, donde se ubica el polylinker. Por tanto las bacterias con plásmido recombinante son ampicilino - resistentes y carecen de función β – galactosidasa, originando colonias blancas (la degradación de X-gal produce un precipitado azul sobre la colonia). Las colonias blancas fueron aisladas en LB. Se realizó PCR directa de los clones de cada transformante.

c.13.5) PCR directa de cultivo bacteriano líquido

Se partió de precultivos 3-4 mL LB ampicilina (antibiótico correspondiente) toda la noche a 37°C y a 200 rpm de cada una de las colonias seleccionadas (blancas) que contenía el vector recombinante. Se pasaron 200 µL a un tubo de PCR, se centrifugaron 1 minuto a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante con pipeta. Finalmente se resuspendió el pellet 50 µL H₂O mQ. Se realizó la lisis celular en termociclador (*Labnet Multi Gene II*), de acuerdo al programa: 10 a 15 minutos a 99°C, 3 minutos a 4°C. Se centrifugó 1 minuto a 5000 rpm, y se tomaron 2 µL del sobrenadante para la reacción de PCR, realizada con los oligonucleótidos: pCR2.1_amp R1 y pCR2.1_ampF1.

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL, conteniendo: buffer 2,5 µL (x), MgCl₂ 0,75 µL (x), dNTPs 2,5 µL (1,84 mM), pCR2.1_amp R1 1,25 µL, pCR2.1_ampF1 1,25 µL, Taq Polymerase Recombinant Invitrogen 0,125 µL. Se utilizó el programa: 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos (30 segundos 94 °C, 30 segundos 62 °C, 30 segundos 72 °C). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis de gel de agarosa 0,8 % teñidos con bromuro de etidio para constatar la presencia del producto de PCR esperado.

c.13.6) Extracción de ADN en minipreps

La extracción de ADN de las células bacterianas se realizó por medio de minipreparaciones partiendo de un cultivo de cada colonia aislada en 3 mL de LB – ampicilina incubado toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugaron 1,5 mL a 12000 rpm durante 2 minutos y se agregaron 200 µL de solución I, 200 µL de solución II y 200 µL de solución III dejándolo 15 minutos en hielo. Se centrifugó durante 10 minutos a 12 000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se realizó una extracción con fenol – cloroformo – isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 6 minutos a 9000 rpm. Se agregó 1 volumen de cloroformo – isoamílico (24:1) y se centrifugó durante 6 minutos a 9000 rpm. La precipitación se realizó con 2 volúmenes de EtOH 96 % y 1/10 de volumen de NaAc 3M centrifugando durante 15 minutos a 12 000 rpm a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 30 µL de agua mQ.

Solución I: 100 µL de ARNasa (10 mg/mL) en 10 mL de TE.

Solución II: 1% de SDS y 0,2 M de NaOH. Se prepara en el momento de usar.

Solución III: 60 mL de KAc 5M, 11,5 mL de HAc glacial y 28,5 mL de H₂O. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121 °C).

La secuenciación automática la realizó Automatic Sequencing Service of Macrogen (Seoul, Korea).

6.4- MEDIOS DE CULTIVO**Extracto de malta - Agar**

Extracto de malta.....12.5 g
 Agar.....20 g
 Agua destilada.....1000 ml

Agua de malta

Extracto de malta.....12.5 g
 Agua destilada.....1000 ml

Agua de malta con peptona

Extracto de malta.....12.5 g
 Peptona.....3 g
 Agua destilada.....1000 ml

LB

Agua desionizada..... 1000 ml
 Bacto triptona..... 10 g
 Bacto extracto de levadura..... 5 g
 NaCl.....10g
 NaOH 5N (ajuste de pH a 7). Esterilizar en autoclave.

SOB

Agua..... 100 ml
 Bacto triptona..... 2%
 Bacto extracto de levadura..... 0.5%
 NaCl.....10 mM
 KCl2.5 mM.
 NaOH 5 N (ajusta pH a 7)
 Autoclavar fraccionado en 10 mL por frasco

SOC

SOB, al que se adiciona:
 MgCl₂ (10mM), MgSO₄ (10mM) y glucosa (20mM).

RB

Acido trans aconítico.....1,73 g

KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
Tartrato de amonio.....	1,6 g
Glucosa.....	10 g
Tiamina.....	1 mg
Solución mineral.....	10 ml
Agua destilada.....	1000 ml

Solución mineral: 1000 ml de agua destilada; 1,5 g ácido acetonitrilo; 3 g MgSO₄.7H₂O; 0,5 g MnSO₄.7H₂O; 1 g NaCl; 0,1 g FeSO₄.H₂O; 0,1 g CoSO₄; 0,1 g CaCl₂; 0,1 g ZnSO₄.7H₂O; 0,01 g CuSO₄; 0,01 g AlK(SO₄).12H₂O; 0,01 g H₃BO₃ y 0,01 g NaMoO₄.H₂O.

CLB

Idem RB pero con 2 g Glucosa/ 1000 ml agua destilada.

NLB

Idem RB pero con 0,2 g Tartrato de amonio/ 1000 ml agua destilada.

SOLUCIONES

Buffer TBE (Tris-Borato-Edta) 5x

Tris base.....	54 g
Ácido bórico.....	27.5 g
EDTA 0.5M (pH8.0).....	20ml

10% (v/v) de glicerol

Glicerol (densidad 1,26g/cc).....	12,6 g
Agua.....	90 ml

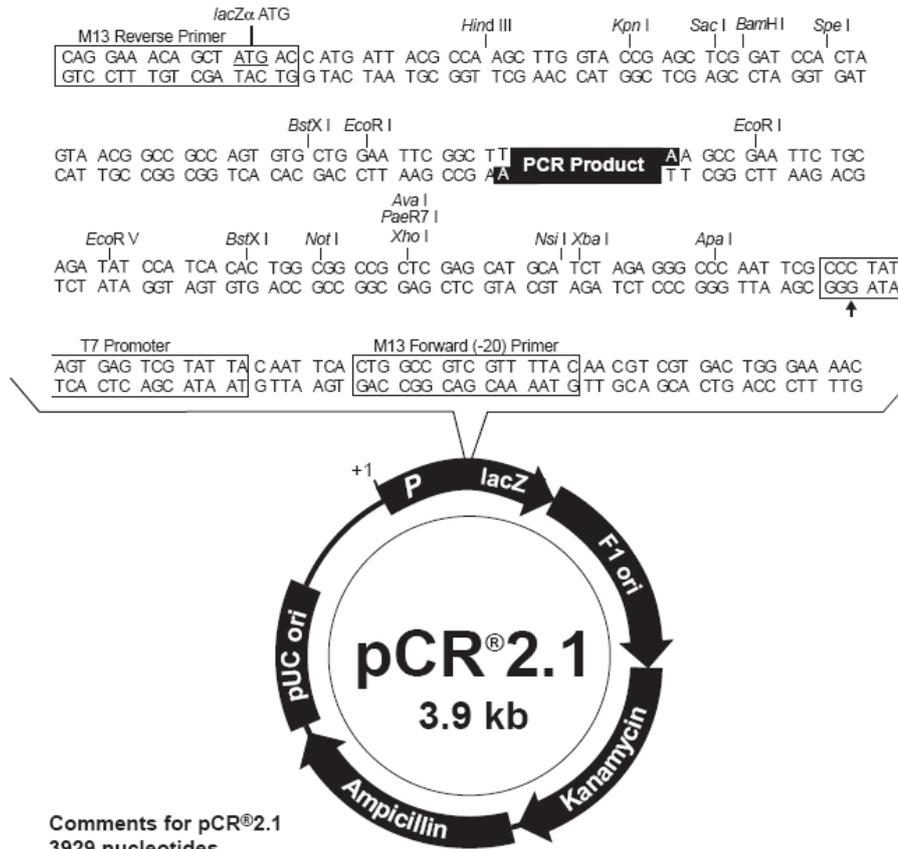
Autoclavar o filtrar estéril.

TE

Tris -Hcl pH 7,6.....	10 mM
EDTA pH 8.....	1 mM

Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121 °C).

6.5 - Vector de clonación.



Comments for pCR[®]2.1
3929 nucleotides

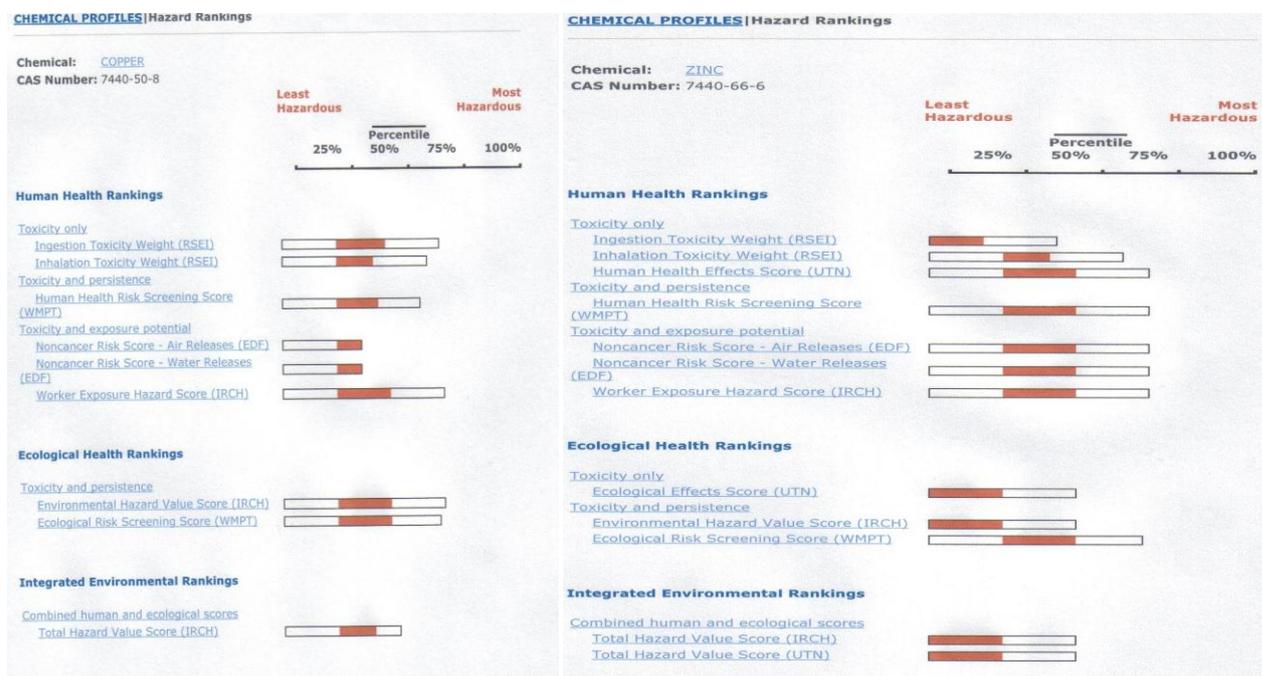
- LacZ α gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807



8 - ANEXOS

A . 1 - INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA SOBRE LOS METALES USADOS

COMPARACIÓN TOXICOLÓGICA DEL Zn Y Cu



Zn

Es ubicuo en el ambiente, tiene baja toxicidad para mamíferos y no se acumula con la exposición continua, la cual es rara. Su ecotoxicidad aparece a muy altas concentraciones aunque se debe considerar su biodisponibilidad y otros factores ambientales al determinarla (Klaassen *et al.*, 1996; de Azevedo & da Matta, 2003).

La dosis letal media oral para ratas de sulfato de zinc es $LD_{50} = 1710 \text{ mg kg}^{-1}$ y para ratones $LD_{50} = 926 \text{ mg kg}^{-1}$ (World Health Organization, 2001). No hay antecedentes de que sea teratogénico, salvo probablemente a elevadas dosis. Estudios muestran que no presenta riesgo mutagénico.

No se bioacumula en la cadena trófica y los vegetales no lo concentran por encima de los niveles presentes en el suelo (De azevedo y Da Matta, 2003).

Mn

Las dosis letales medias reportadas para sulfatos de manganeso y acetato de manganeso en ratas sujetas a exposiciones orales únicas fueron $LD_{50} = 782 \text{ mg kg}^{-1}$ y $LD_{50} = 1082 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal por día, respectivamente (Smyth *et al.*, 1969; Singh y Junnarkar, 1991).

La información en la literatura es escasa sobre su neurotoxicidad, potenciales carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis ((World Health Organization, 2001; De azevedo y Da Matta, 2003).

A.2 - ENSAYOS REALIZADOS CON COBRE

a) EFECTO DEL CuSO_4 SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL

A los efectos de comparar los resultados obtenidos con el ZnSO_4 con un fungicida análogo de eficacia conocida se realizaron los mismos ensayos en placa empleando CuSO_4 . Se analiza la influencia sobre el crecimiento y sobre la actividad ligninolítica, a través de la degradación de colorantes poliméricos.

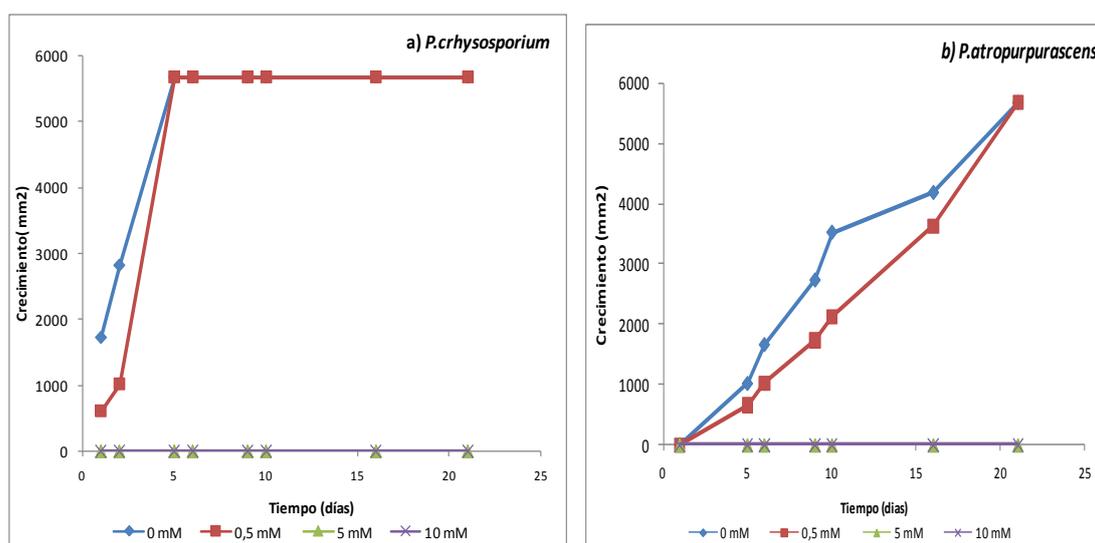


Figura A1: Curva de crecimiento en presencia de CuSO_4 : A) *P. chrysosporium*; B) *P. atropurpurascens*. Las concentraciones se refieren al Cu.

La solución de CuSO_4 inhibe totalmente el crecimiento de los hongos estudiados a una concentración de 5 mM; en tanto que a 0,5 mM, el *P. chrysosporium* no es influenciado significativamente ($P < 0,005$), en tanto que *P. atropurpurascens* disminuye ligeramente su velocidad de crecimiento respecto al crecimiento sin metales. Estos resultados son similares a los obtenidos con la solución de ZnSO_4 ; los valores de CIM estarán entre 0,5 y 5 mM en metal.

b) EFECTO DEL SOBRE LA ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA: DEGRADACIÓN DE COLORANTES POLIMÉRICOS

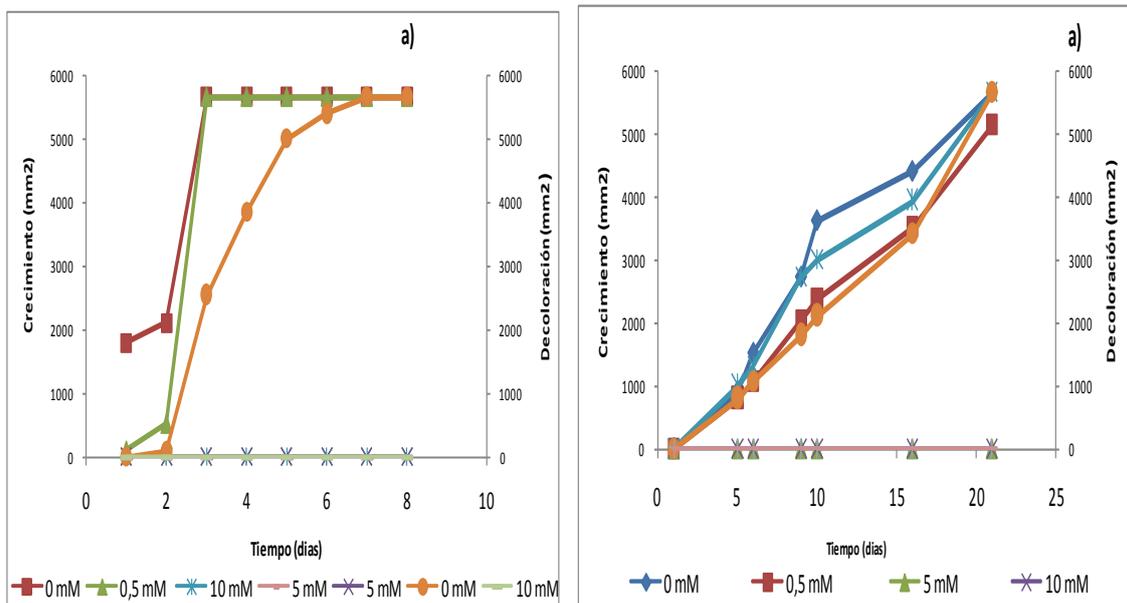


Figura A2: Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm²) en presencia de CuSO₄ cuando se adiciona al medio RBBR para: A) *P. chrysosporium*; B) *P. atropurpurascens*.

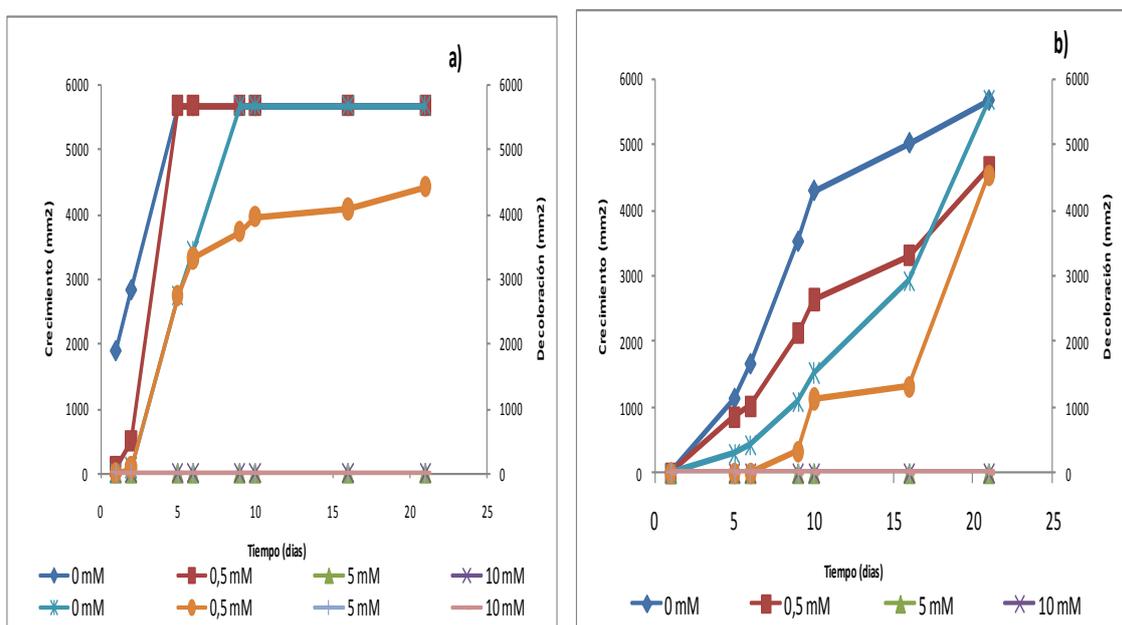


Figura A.3: Crecimiento micelial y el halo de decoloración (mm²) en presencia de CuSO₄ cuando se adiciona al medio Poly-R para: A) *P. chrysosporium*; B) *P. atropurpurascens*.

La actividad ligninolítica de los hongos se ve influenciada por la presencia de la solución de CuSO_4 . A una concentración de 0,5mM en Cu hay degradación del colorante polimérico en ambos hongos. Cuando la concentración de metal sube a 5 mM, no se produce decoloración.

El valor de la CIMD se encuentra entre 0,5 y 5 mM en Cu.

A.3 - GRÁFICOS CON LAS CURVAS DE CRECIMIENTO Y EL HALO DE DECOLORACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO (DÍAS) AL ADICIONAR LOS METALES AL MEDIO

a) $ZnSO_4$ en el medio de cultivo

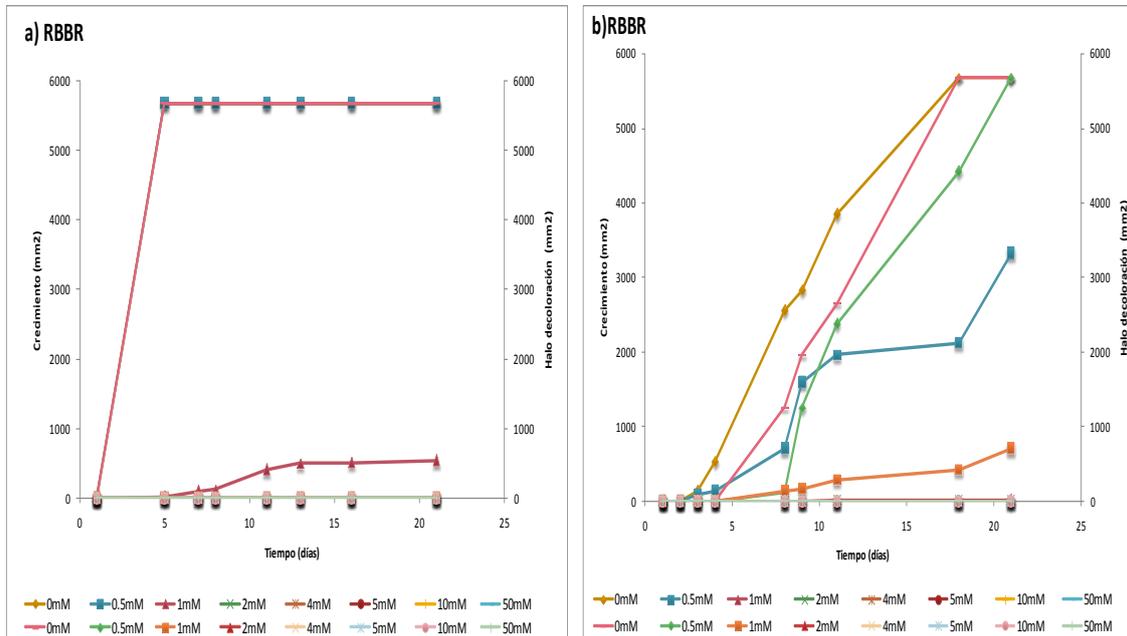


Figura A.4: Crecimiento micelial (eje derecho) y el halo de decoloración (eje izquierdo) (mm²) en presencia de $ZnSO_4$ cuando se adiciona al medio RBBR para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

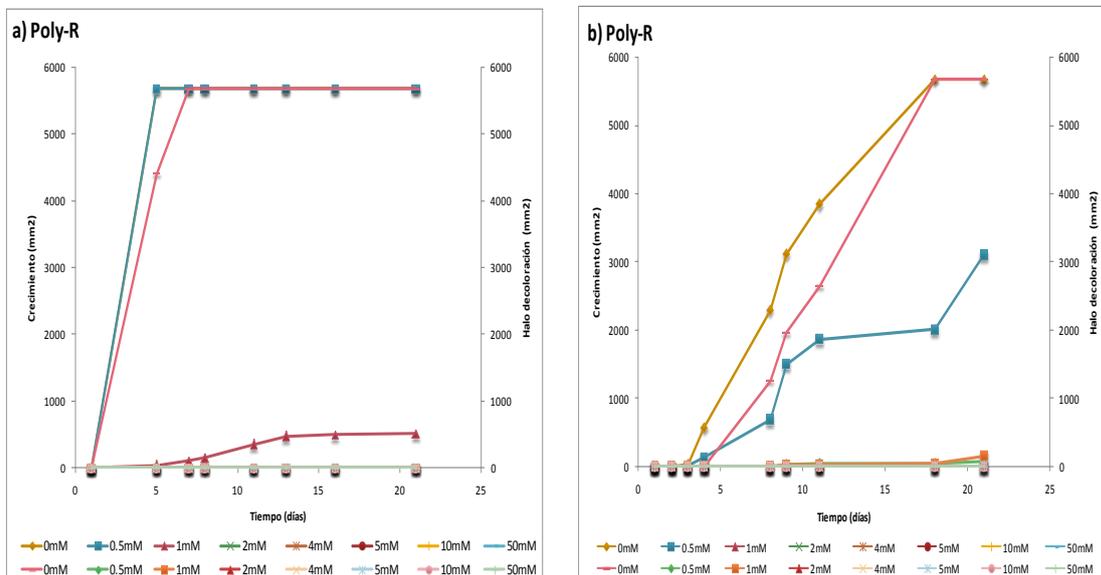


Figura A.5: Crecimiento micelial (eje derecho) y el halo de decoloración (eje izquierdo) (mm²) en presencia de $ZnSO_4$ cuando se adiciona al medio Poly-R para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

b) ZnSO₄ – MnSO₄ en el medio de cultivo

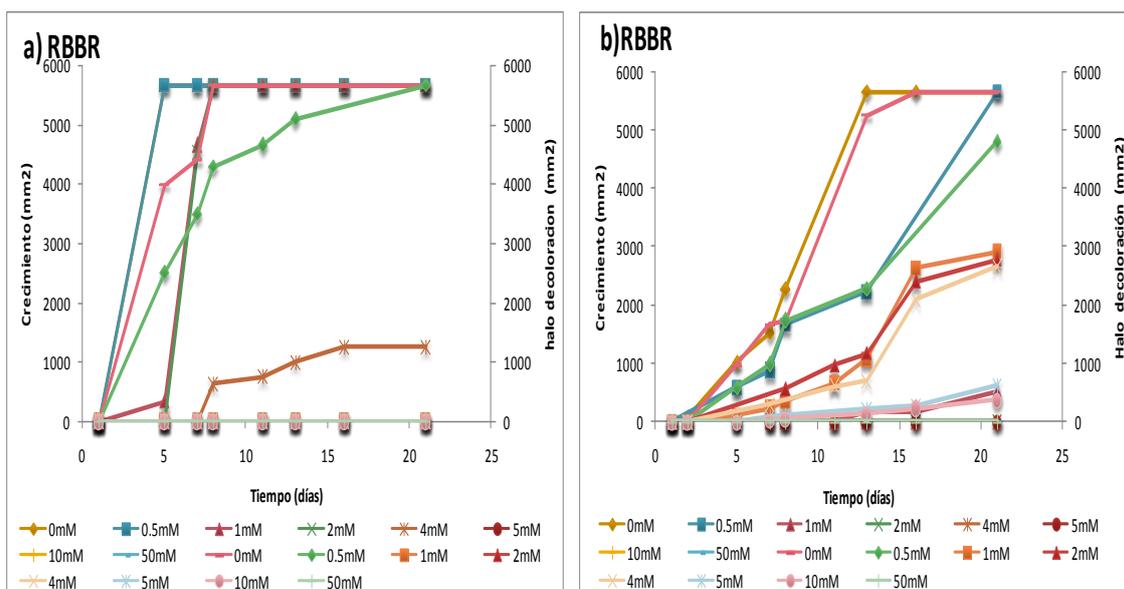


Figura A6: Crecimiento micelial (eje derecho) y el halo de decoloración (eje izquierdo) (mm²) en presencia de ZnSO₄ – MnSO₄ cuando se adiciona al medio RBBR para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

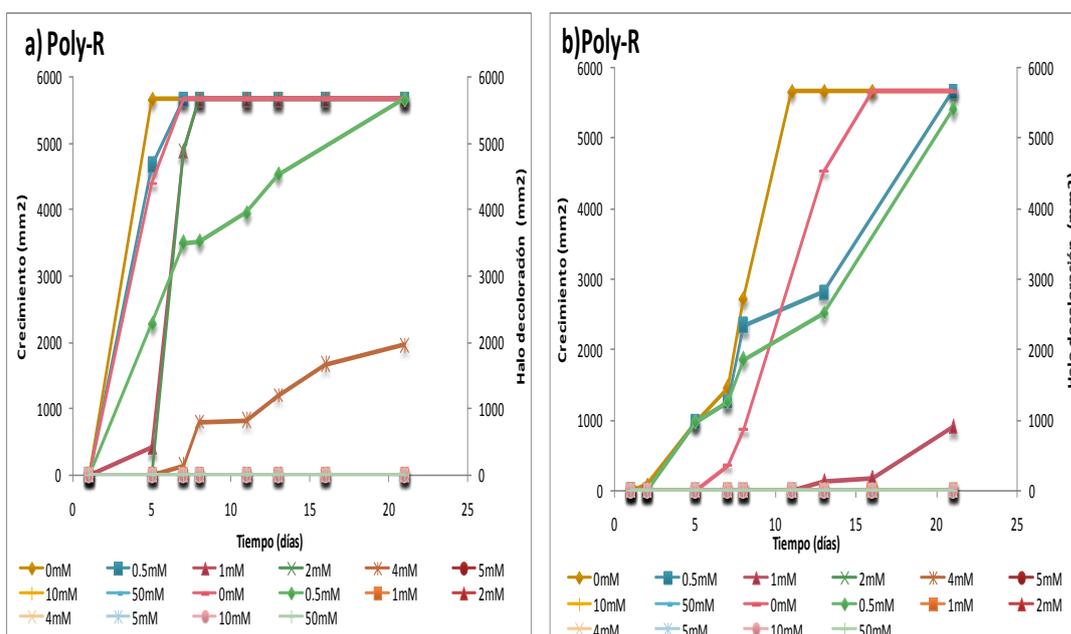


Figura A7: Crecimiento micelial (eje derecho) y el halo de decoloración (eje izquierdo) (mm²) en presencia de ZnSO₄ – MnSO₄ cuando se adiciona al medio Poly-R para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

b) $MnSO_4$ en el medio de cultivo.

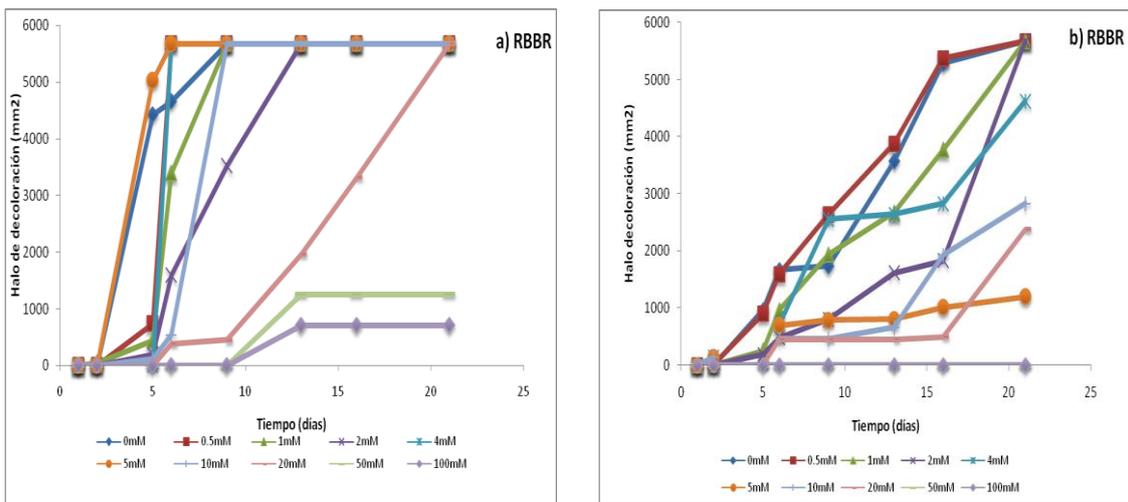


Figura A8: Halo de decoloración (mm²) en presencia de $MnSO_4$ cuando se adiciona al medio RBBR para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

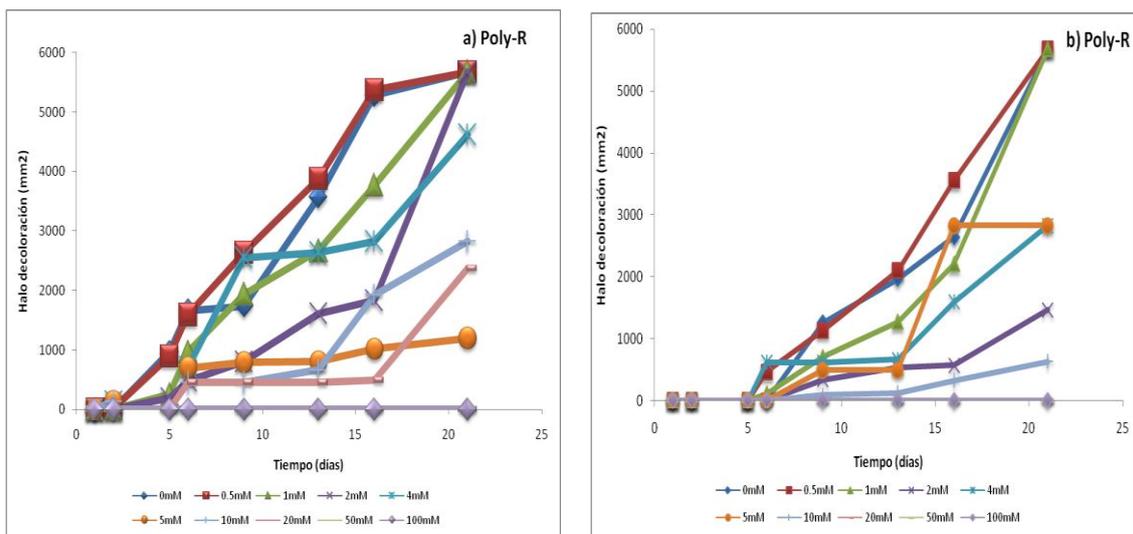


Figura A9: Halo de decoloración (mm²) en presencia de $MnSO_4$ cuando se adiciona al medio Poly-R para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

d) Solución problema adicionada al medio de cultivo

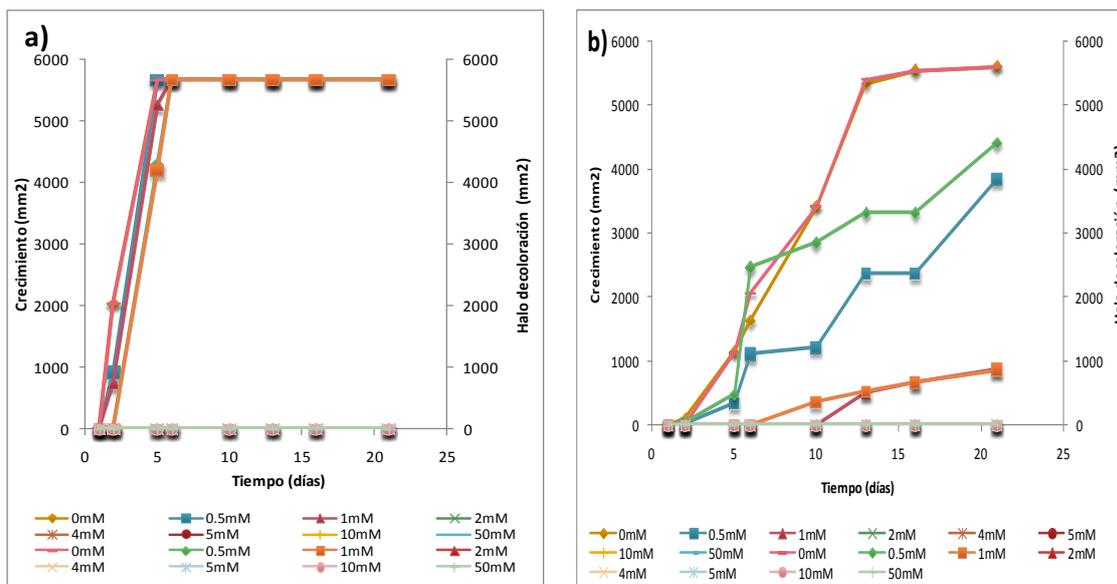


Figura A10: Crecimiento micelial (eje derecho) y el halo de decoloración (eje izquierdo) (mm²) en presencia de la solución proveniente del proceso de reciclado de pilas en el medio RBBR para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

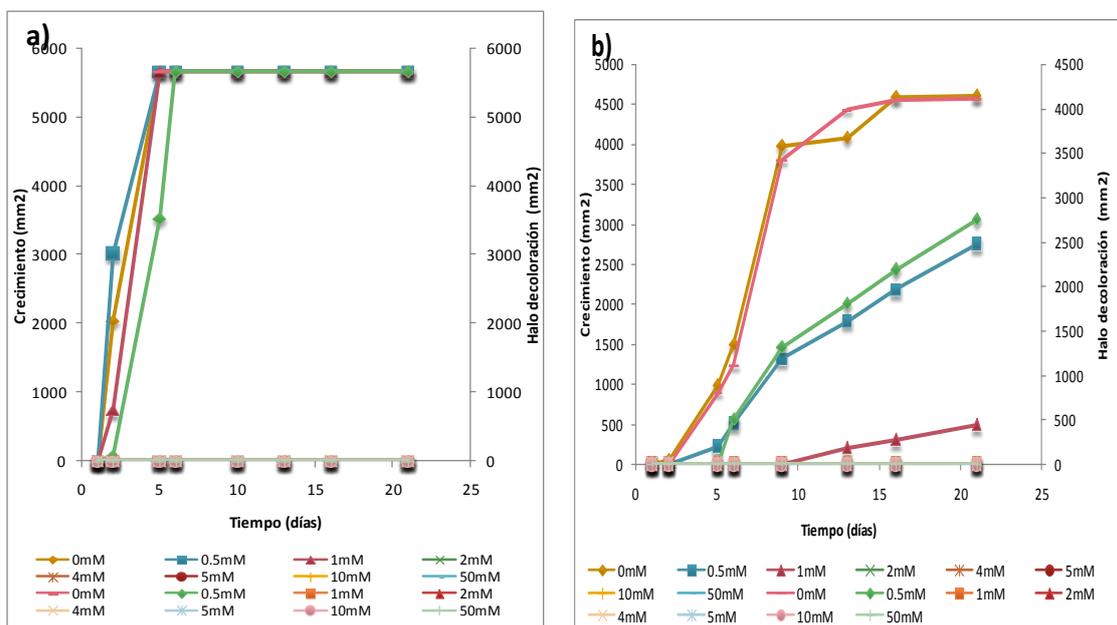


Figura A.11: Crecimiento micelial (eje derecho) y el halo de decoloración (eje izquierdo) (mm²) en en presencia de la solución proveniente del proceso de reciclado de pilas en el medio RBBR para: a) *P. chrysosporium*; b) *P. atropurpurascens*.

B - PCR EN TIEMPO REAL

Generalidades

En una qPCR, la amplificación es monitoreada en tiempo real mediante el uso de métodos fluorescentes, combinando la amplificación del gen de interés con la detección del producto en un único paso a la vez que correlaciona la intensidad de la señal fluorescente con la concentración de los productos amplificados (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996; Nazarenko *et al.*, 1997). O sea que la acumulación de productos específicos se monitorea continuamente durante cada ciclo por el cambio de fluorescencia (Saunders, 2004).

Desde la aparición de la primera tecnología que combinó la amplificación exponencial de la PCR de un transcripto específico, con el monitoreo del ADN sintetizado en cada ciclo de PCR en 1993, se han incrementado las investigaciones, publicaciones y usos de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2001; Saunders, 2004). Hoy en día se la encuentra en numerosos campos: medicina forense, diagnóstico clínico (diagnóstico de tumores, respuesta a medicamentos en cánceres humanos y el perfil de citocinas en la respuesta inmune), control alimentario, análisis de organismos modificados genéticamente, etc. Es una técnica cada vez más utilizada en todos los laboratorios del mundo por su alta sensibilidad y especificidad, su buena reproducibilidad (Higuchi *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1996; Orlando *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 1999; Schmittgen *et al.*, 2000), su robustez y su amplio rango de cuantificación (Heid *et al.*, 1996), que se unen a la baja probabilidad de contaminación, la exactitud de los resultados y la sencillez y rapidez del método. La validación de los resultados de experimentos con microordenamientos (*microarray*) de DNA se suele realizar mediante qPCR.

El análisis cuantitativo del producto, se realiza mediante la curva de amplificación, la cual está constituida por cuatro fases distintas: 1) fase inicial o de latencia (lag) donde la acumulación de producto no se puede detectar por estar debajo del umbral, 2) fase de amplificación exponencial que puede ser detectada (en general son 10 desviaciones estándar de la línea de base), 3) fase de eficiencia de amplificación lineal y 4) fase de meseta o saturación, donde disminuye la velocidad de acumulación de producto (Wong & Medrano, 2005).

Solo en la fase exponencial, la cantidad de gen de interés amplificado es directamente proporcional a la cantidad de gen de partida. Además hay correlación entre el tiempo y el número de copias de las moléculas sintetizadas, por lo tanto se puede extrapolar al comienzo de la reacción (ciclo 0) para determinar el número inicial de copias de molde.

Métodos de detección

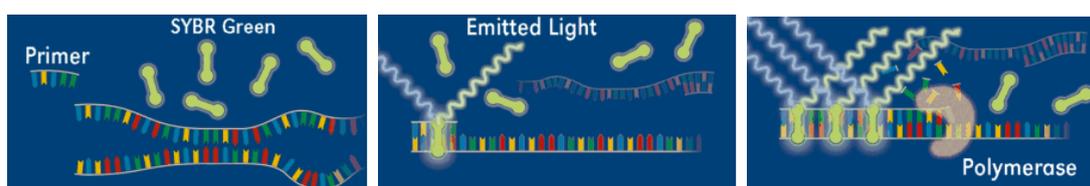
Para llevar a cabo la amplificación por qPCR se necesita un termociclador con capacidad para detectar y medir la fluorescencia. La exactitud y la precisión de los equipos es afectada por la relación señal:ruido, la cual depende del tipo de detección (fluoróforos), de la calidad del sistema óptico y de la

homogeneidad de la temperatura dentro del instrumento, ya que la menor desviación de la temperatura llevaría a una cuantificación errónea.

Las señales fluorescentes a detectar, proporcionales a la cantidad de producto de PCR, son generadas por sondas fluorescentes de oligonucleótidos de secuencia específica (Taqman, las balizas moleculares (*molecular beacons*)) o por moléculas fluorescentes de detección genérica que presentan especificidad frente al ADN doble cadena (ADNc), basadas en la transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET) desde un donador a un aceptor de fluoróforo (Wilhelm & Pingoud, 2003).

La molécula fluorescente de detección genérica más usada es el SYBR Green I (Kishino *et al.*, 1994; Singer *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2004); esta molécula se une al surco menor del ADNc doble cadena, independientemente de la secuencia. La afinidad de la unión es más de 100 veces mayor que la del bromuro de etidio. Una de las características del SYBR que la hace adecuada para el uso en PCR en tiempo real, es que la fluorescencia de la molécula unida es más de 1000 veces mayor que la de la molécula libre, permitiendo el seguimiento de la acumulación de producto durante la reacción de PCR (Wittwer *et al.*, 1989, 1997). Durante la elongación más y más moléculas de SYBR-Green se enlazan al ADN sintetizado, lo que incrementa la fluorescencia emitida. La detección con SYBR-Green I es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula. Debe ser optimizado para cada set de oligonucleótidos, al igual que el resto de los componentes de la reacción de PCR (Edwards, 2004).

Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos que luego el fluoróforo detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados, lo cual además disminuye la eficiencia de los oligonucleótidos.

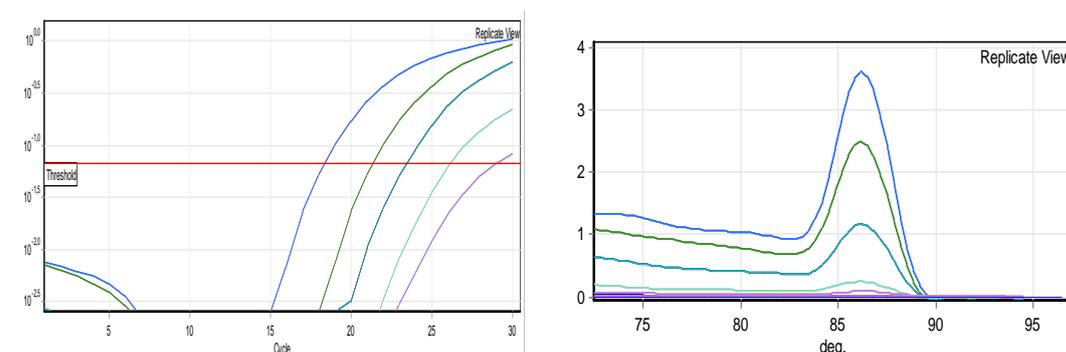


(Imágenes de Biosearch Technologies <http://www.biosearchtech.com>).

Resultado de la amplificación

Se visualiza a través de las curvas de amplificación. El número de copias del molde puede ser estimado con gran precisión a través del número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, o sea que la señal alcance el umbral (*threshold*) arbitrario. El umbral es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde y debe interceptar la curva en la fase exponencial, en la cual el aumento de señal se correlaciona con la acumulación de producto. El punto de intersección es el llamado *threshold value* (Ct) o *crossing point* (CP) (Wilhelm & Pingoud, 2003).

Se pueden obtener resultados absolutos o relativos de acuerdo al ensayo realizado. Si se conoce la concentración absoluta de moléculas de molde en los patrones, los resultados serán absolutos. Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión en los tratamientos a analizar, normalmente un gen de referencia (*housekeeping*). Comparando los Ct del gen de referencia con el gen problema en muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema.



Curva de amplificación por PCR en tiempo real, junto a su correspondiente curva de fusión.

Otro resultado a analizar es la curva de fusión del producto (curvas de *melting*) que permite la caracterización de las secuencias amplificadas, detectando variaciones en la misma, en base a sus temperaturas de fusión (T_m), que dependen de la composición de bases del amplicón y en menor grado de la longitud (Ririe *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 1998; Saunders, 2004). La T_m se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión del ADN doble y depende de la temperatura del producto de amplificación. Los equipos analizan este dato a través del gráfico de la derivada de la señal fluorescente respecto a la temperatura, versus la temperatura. Esta curva (curva de fusión) presenta picos; el pico máximo (máxima velocidad de cambio de fluorescencia) corresponde a la temperatura de fusión del producto (T_m) (Lee *et al.*, 2004). El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto.

Las curvas de fusión de sondas específicas de secuencia se utilizan para el genotipado resolviendo diferencias de base entre la secuencia diana y la sonda (Lay & Wittwer, 1997; Whitcombe *et al.*, 1998).

Eficiencia de amplificación

La eficiencia de amplificación es el principal indicativo acerca del buen procedimiento de la reacción de PCR. Tradicionalmente se calcula usando los datos de una curva estándar mediante la fórmula de la ecuación 1 (Rasmussen, 2001).

$$\text{Amplificación exponencial} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Ecuación 1

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente}) - 1}$$

La eficiencia de amplificación varía a lo largo de la reacción, en la fase exponencial temprana se mantiene relativamente estable, luego va declinando gradualmente a cero. El cálculo de la eficiencia mediante una curva estándar no es representativo de estos cambios y se puede sobreestimar el valor de la misma por ello la eficiencia durante la fase exponencial se calcula mediante métodos basados en datos crudos obtenidos durante la fase lineal de la reacción de PCR, donde el aumento absoluto de fluorescencia en cada ciclo de PCR refleja la verdadera cinética de reacción. Los datos obtenidos durante la fase exponencial son transformados en logaritmo y graficados, la pendiente de la regresión lineal representa la eficiencia de amplificación de la muestra. Este valor es más preciso que el obtenido mediante una curva estándar. En la práctica, se utilizan muestras que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas del gen de interés; el *software* del instrumento construye una recta que relaciona los Ct con las concentraciones conocidas a partir de la cual determina la eficiencia.

Siempre es más efectivo calcular la eficiencia de amplificación desde los datos crudos de fluorescencia, usando un set de diluciones seriadas, más que una curva estándar, no solo para chequear el rango dinámico del ensayo, sino para asegurar la exactitud de la cuantificación (Wong & Medrano, 2005).

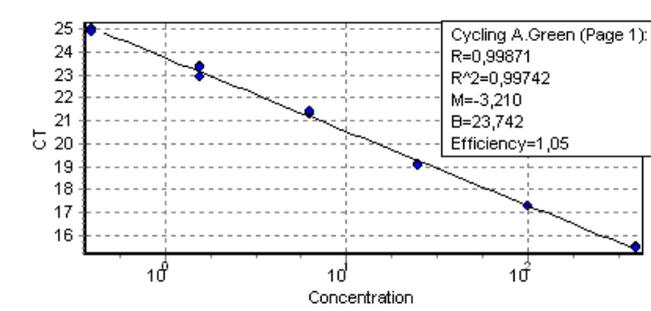


Gráfico que relaciona el Ct de muestras con las concentraciones conocidas del gen de interés en diluciones seriadas que permiten determinar la eficiencia de amplificación.

Las moléculas como el SYBR Green I, detectan además del producto de interés, productos inespecíficos, como los dímeros de oligonucleótidos, lo que constituye una desventaja frente a los sistemas de detección específica de la secuencia de interés. Las amplificaciones inespecíficas se visualizan a través de las curvas de fusión, donde aparecen como picos de *melting* en una posición distinta a la esperada (Ririe *et al.*, 1997) debido a la diferente longitud y composición de bases de estos productos respecto al gen de interés.

La consecuencia de las amplificaciones inespecíficas es la disminución de la eficiencia de amplificación de los productos de interés, lo que resulta en un error sistemático. Esta es la razón por la cual más allá del sistema de detección el ensayo debe ser optimizado.

Estrategias de cuantificación

En lo que refiere al estudio de la expresión génica, el uso de PCR en tiempo real para la amplificación de ADNc producto de la transcripción reversa de ARNm (qRT-PCR), se está convirtiendo en una técnica de rutina en los laboratorios de biología molecular. Generalmente son posibles dos estrategias de cuantificación en qRT-PCR. Los niveles de los genes expresados pueden ser medidos por una cuantificación absoluta o una relativa. La cuantificación absoluta determina el número de copias de partida relacionando la señal de PCR con una curva estándar mientras que la cuantificación relativa se mide el cambio relativo en el nivel de expresión de mRNA (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2004). En este último tipo de cuantificación la normalización del gen de interés se realiza utilizando un gen de referencia interno; los más nombrados en la bibliografía son: GPD, albúmina, actina, tubulina, ARNr 18s, ARNr 28s entre otros (Marten *et al.*, 1994). La normalización es crítica para obtener resultados, biológicamente relevantes. Un gen de referencia interno se refiere a genes que se expresan constitutivamente y bajo todas las condiciones, independientemente del diseño experimental. Dicho gen, control endógeno invariante, corrige la variación muestra a muestra y elimina los errores de cuantificación del ADNc inicial de la PCR en tiempo real. Muchos investigadores aseguran que no existe ningún gen que cumpla todos los criterios requeridos, por lo tanto, debe ensayarse más de uno y luego de identificar el gen más apropiado, validar la elección de acuerdo a las condiciones experimentales (Bustin *et al.*, 2004). Para seleccionar el gen adecuado desde una combinación de genes de referencia, se puede emplear alguno de los *software* que utilizan distintos factores de normalización, como por ejemplo el más sencillo de ellos que aplica la media geométrica (Vandesompele *et al.*, 2002).

Para determinar los niveles de expresión se mide la diferencia (Δ) entre los ciclos umbral (Ct) y se compara la expresión del gen de interés con respecto a un grupo calibrador: un control no tratado, un punto de tiempo cero o individuos sanos (Livak & Schmittgen, 2001; Morse *et al.*, 2005). Existen varios modelos matemáticos de expresión relativa basados en las diferencias de Cts. Los valores de Ct pueden determinarse mediante varios algoritmos (Pfaffl, 2007). Los métodos más conocidos son “el método de la curva estándar”, “delta- delta Ct” y el “modelo de Pfaffl”.

En el método de la curva estándar se determina la cantidad de cada muestra mediante una curva estándar y se expresa esa cantidad en relación a una muestra calibrador, al que se le asigna el valor uno. Este método se aplica cuando las eficiencias del gen de interés y el de referencia no son iguales (Liu & Saint, 2002).

El método delta – delta Ct es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como la diferencia relativa entre una muestra experimental y una muestra calibrador. Este método asume eficiencias de amplificación óptimas tanto para el gen de interés como para el gen de referencia

(Livak & Schmittgen, 2001). Aunque es posible realizar correcciones para eficiencias de amplificación no ideales, la cinética de amplificación del gen de interés y el de referencia deben ser aproximadamente iguales (Medhurst *et al.*, 2000), porque pequeñas diferencias en las eficiencias generan errores cuando se utiliza este método (Liu & Saint, 2002a).

El método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) combina la cuantificación relativa y la normalización en un único cálculo. Para corregir las diferencias entre los ensayos (normalización) este modelo incluye en el cálculo de las eficiencias de amplificación del gen de interés y la del gen de referencia (Pfaffl *et al.*, 2002). El cociente de expresión relativa (R) se calcula basado en la eficiencia y la desviación de Ct entre una muestra problema y un calibrador y se expresa en comparación a un gen de referencia como se muestra en la ecuación 2. Donde E_{GOI} es la eficiencia de PCR en tiempo real del gen de interés y E_{ref} la del gen de referencia. ΔCt_{GOI} es el Ct del calibrador menos el Ct de la muestra para el gen de interés y Ct_{ref} es el Ct del calibrador menos el de la muestra para el gen de referencia (Pfaffl, 2001). Para el cálculo de R mediante el método de Pfaffl sólo se necesitan los valores de las eficiencias individuales y las diferencias de Ct de cada transcripto en cuestión.

$$R = (E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}(\text{calibrador-muestra})} / (E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}(\text{calibrador-muestra})}$$

La técnica de PCR en tiempo real es fácil de llevar a cabo si se utiliza un adecuado modelo matemático para el análisis de los datos, la técnica proporciona la precisión necesaria y provee de resultados de cuantificación rápidos y confiables (Pfaffl, 2001).

C – DURABILIDAD ADQUIRIDA Y EFECTIVIDAD DE TRATAMIENTOS ANTILIXIVIANTES EN MADERA TRATADA CON Zn Y Mn 1

Ibáñez C.¹; Mantero C.²; Silva L.¹; Rabinovich M.¹; Cerdeiras M.³; Cecchetto G.³; Escudero R.²; Franco J.⁴

1Unidad Académica de Gestión Tecnológica, Facultad de Química, Universidad de la República;

2 Departamento Forestal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República;

3 Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República.

Gral. Flores 2124. Casilla de correo 1157 Fax. 929 19 06. Montevideo Uruguay

cmibanes@fq.edu.uy

4 Departamento de Biometría y estadística, Facultad de Agronomía, Universidad de la República

Resumen

Como parte del estudio de la aplicación de una solución obtenida en un proceso de reciclado como preservante para madera, se estableció el primer cementerio de estacas de madera para evaluar la durabilidad adquirida en probetas de *Pinus taeda* L. basados en la norma internacionalmente aceptada EN 252. El ensayo se instaló en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía (UdelaR) en un suelo que en la clasificación del USDA corresponde a un: Mixture, Termic, Active, Fine, Tipic Argiudol. Las probetas fueron tratadas en primer lugar por el método de célula llena con la mencionada solución que es el producto principal de un proceso hidrometalúrgico de reciclado de pilas domésticas comunes y alcalinas usadas, libre de emisiones y efluentes, desarrollado en la Facultad de Química. Dicha solución es ácida, contiene 32 g l⁻¹ de Zn y 15 g l⁻¹ de Mn como sulfatos y está libre de metales pesados. En ensayos de laboratorio previos ha demostrado poseer definidas propiedades funguicidas e insecticidas frente a organismos que degradan madera, a concentraciones menores a 3% en Zn (que es la máxima concentración que se obtiene del proceso de reciclado, sin modificaciones que eleven su costo). En condiciones de uso en exteriores, con humedad elevada, la solución se lixivia dejando la madera desprotegida. Por lo tanto, se realizó un tratamiento posterior antilixivante a las probetas ya tratadas con la solución en estudio, con una solución de bórax al 2%. La aplicación del bórax por el método de célula llena presenta mayor efecto antilixivante que cuando se aplica por métodos de menor costo como el pincelado. Se presentan los resultados correspondientes a la evaluación a 6, 14 y 20 meses del inicio del cementerio de estacas. Se compara además la durabilidad natural y la durabilidad adquirida de las probetas, tanto con nuestra solución como con CCA a dos niveles de retención distintos. Por último se presentan los principales agentes de deterioro de madera (insectos, hongos y bacterias) hallados en las probetas.

Palabras clave: zinc, bórax, preservantes para madera, manganeso, cementerio de estacas.

¹ Manuscrito presentado al Congreso Iberoamericano de Preservación de Madera (RIPMA), Mar del Plata, Argentina, diciembre 2010.

Summary

As part of the study of the application of a solution obtained in a recycling process as a wood preservative, a graveyard assay of wooden stakes was established to assess the acquired durability in loblolly pine (*Pinus taeda L.*) specimens. The trial was installed following the internationally accepted standard EN 252 and established in the Southern Regional Center of the Faculty of Agronomy (UdelaR) in soils that in the USDA classification correspond to: Mixture, Thermal, Active, Fine, Typic Argiudol. The specimens were treated first by the full cell method with the mentioned solution which is the main product of a hydrometallurgical process for recycling used common and alkaline household batteries, free of emissions and effluents, developed at the Faculty of Chemistry. This solution is acidic, containing 32 g l⁻¹ Zn and 15 g l⁻¹ of Mn as sulfates and free of heavy metals. In previous laboratory tests the solution proved to have definite fungicidal and insecticidal properties against organisms that degrade wood, at concentrations lower than 3% Zn (the highest concentration obtained from the recycling process, without amendments that raise the cost). Under conditions of outdoor use, with high humidity, the solution is leached, leaving the wood unprotected. Therefore, a second treatment was applied to the specimens in order to prevent leaching. A solution 2% in borax was applied by the full cell method and by brushing. Application of borax by full cell method showed to be better in preventing leaching than lower cost methods, like brushing. Results obtained during inspections after 6, 14, and 20 months in the graveyard are presented. Natural and acquired durability are compared using different concentrations of the studied solution as well as CCA at two different retention levels. Main degrading agents (insects, fungi and bacteria) found in the specimens are also described.

Key words: zinc, borax, Wood preservers, manganese, stakes graveyard.

Introducción

Como parte de un estudio en curso sobre la aplicación de una solución obtenida en un proceso de reciclado como preservante para madera. Se estableció un cementerio de estacas para evaluar la durabilidad adquirida en probetas de *Pinus taeda L.*

El proceso de reciclado mencionado es un proceso hidrometalúrgico, libre de emisiones y efluentes, desarrollado en la Facultad de Química, que recupera los componentes principales de las pilas domésticas comunes y alcalinas. Su producto principal es una solución de pH 2, compuesta de sales de zinc y manganeso como sulfatos en las siguientes concentraciones: Zn 32 g.l⁻¹, Mn 15 g.l⁻¹, donde otros metales pesados se encuentran a nivel de trazas.

El potencial fungicida de dicha solución se verificó a través de pruebas de *screening* en medios de cultivo nutrientes y en probetas de madera, frente a hongos de podredumbre blanda y marrón (Ibáñez *et al.*, 2005). También se verificó su potencial insecticida frente a termites. Asimismo, se comprobó que en condiciones de humedad elevada la solución se lixivia, dejando la madera desprotegida (Ibáñez *et al.*, 2008a). Por esta razón se ensayó a nivel de laboratorio un tratamiento posterior antilixivante a las probetas ya tratadas con la solución en estudio con una solución de bórax al 2% (Ibáñez *et al.*, 2008b). La aplicación en etapas de diferentes sistemas químicos que potencien sus propiedades como funguicidas, insecticidas, ignífugos o

la fijación a la madera, ha sido empleada como método de mejora en el desarrollo de nuevos productos (Manning, 2008; Marney & Russell, 2008).

El bórax y demás compuestos de boro son ingredientes activos de numerosos preservantes. Son efectivos como ignífugos y contra hongos e insectos, al mismo tiempo son de uso seguro aplicados de acuerdo a buenas prácticas industriales y no constituyen un problema ambiental por su baja eco-toxicidad (Lloyd et al., 1990; Rainer, 1993; Lloyd, 1998). Estas propiedades del bórax, potencian la efectividad del zinc como conservador y se evita la lixiviación de las sales metálicas de la madera por la formación in situ de borato de zinc a nivel superficial. En este trabajo, se compara la efectividad de la aplicación del bórax por pincelado y vacío presión vacío.

El borato de zinc es el menos lixiviable de todos los boratos, pero por su reducida solubilidad no puede aplicarse en madera sólida, es normal incorporarlo como polvo en madera compuesta (Laks, 1995, 1997; Furuno, 2003).

El ensayo se instaló en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía (UdelaR) en un suelo que en la clasificación del USDA corresponde a un: Mixture, Termic, Active, Fine Typic Argiudol.

Materiales y Métodos

El ensayo se instaló siguiendo lo prescrito en la norma EN 252. Se usaron probetas de (500 ± 1) mm x $(50 \pm 0,3)$ mm x $(25 \pm 0,3)$ mm. Se seleccionaron 91 con densidades dentro del rango de la media $0,47 \pm 15\%$. Se secaron hasta un contenido de humedad de $14\% \pm 2\%$. 60 probetas se impregnaron por el método Bethell (30 min.de vacío inicial, 60min. a 10 kg.m^{-2} de presión, 30 min.de vacío final) con la solución en estudio a cuatro concentraciones: 0,8%, 1,5%, 3% y 6% de Zn. Se empleó un autoclave de laboratorio. La máxima concentración de la solución que se logra a partir del proceso de reciclado es del 3% en Zn, por lo cual para lograr la concentración del 6% se agregaron sales puras en la misma proporción.

De las 15 probetas de cada concentración, 5 quedaron solo con la solución, 10 fueron tratadas con bórax al 2%, 5 por pincelado y 5 por vacío presión vacío. 10 probetas se usaron como testigos sin tratamiento. El protector alternativo de referencia utilizado fue CCA, 10 probetas fueron tratadas a una retención de 8 kg.m^{-3} y 11 probetas a una retención de 12 kg.m^{-3} .

Las probetas se colocaron en el campo al azar, enterradas 25 cm en dos filas de 30 probetas y una de 31, separadas 50 cm entre filas y entre probetas.

Los tratamientos del ensayo se nombran y describen en el cuadro N°1

Cuadro N°1 Denominación y descripción de los tratamientos del ensayo

Denominación	Tratamiento	Retención en Zn (kg.m ⁻³)
A1	0,8%Zn	1,17
A2	0,8%Zn+B Pinc	
A3	0,8% Zn + B vpv	
B1	1,5% Zn	2,91
B2	1,5%Zn + B pinc.	
B3	1,5%Zn + B vpv	
C1	3%Zn	7,37
C2	3%Zn + B pinc	
C3	3%Zn + B vpv	
D1	6%Zn	21,22
D2	6% Zn + B pinc.	
D3	6%Zn + B vpv	
E	Blanco	
F	CCA 8 kg.m ⁻³	
G	CCA 12 kg.m ⁻³	

En inspecciones de campo se evaluó deterioro, dureza superficial y resistencia. Se tomaron finas muestras de madera con deterioro para observar al microscopio óptico.

Hasta el momento se realizaron tres evaluaciones del ensayo, a los 6 meses, a los 14 meses y a los 20 meses desde su instalación.

Se utilizó una escala de calificación del grado de deterioro que se muestra en el Cuadro N°2

Cuadro N°2 Escala de calificación del deterioro de probetas

CALIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
0	Sin ataque, madera sana
1	Ataque ligero
2	Ataque moderado
3	Ataque severo
4	Ruptura

Análisis estadístico

La media de la escala, ponderada por el número de repeticiones en que cada valor fue observado, se tomó como variable dependiente en un modelo lineal en el cual la única variable

independiente fue el tratamiento; este análisis produce estimaciones de las medias y pruebas de Chi-cuadrado mediante el uso de mínimos cuadrados generalizados y sin hacer ningún tipo de supuesto distribucional. El procedimiento CATMOD (Categorical Modeling) del Sistema de Analisis Estadístico SAS (SAS Institute ,2007) fue utilizado.

Resultados

En la primera inspección, a los seis meses, no se observaron signos de ataque en las probetas tratadas. Solo algunos blancos (tratamiento E) presentaron ligeros cambios de color principalmente alrededor de la línea de tierra.

En la segunda inspección, realizada a los 14 meses, los testigos y algunas probetas tratadas con la solución sin tratamiento adicional presentaron mohos y hongos de pudrición blanda. En microfotografías se observaron cavidades en la capa S2 de la pared celular y finas hifas (probosis) siguiendo el sentido de las microfibrillas (ver figura 1 a y b). No hay evidencia de deterioro por insectos. Cabe señalar que durante este período se registraron muy escasas precipitaciones. Hasta ese momento las probetas con el tratamiento antilixiviante permanecían sanas, comparadas con aquellas tratadas con CCA.

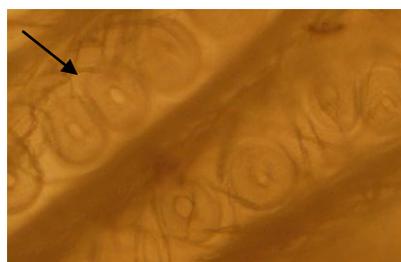
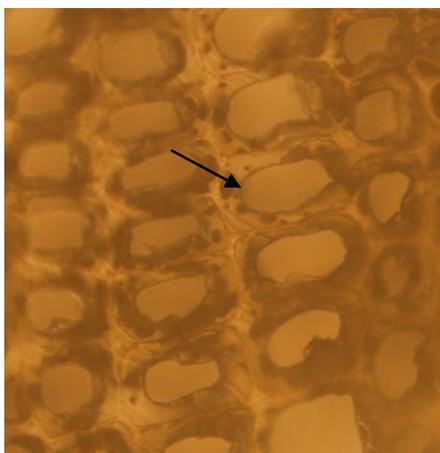


Figura 1: Fotos al microscopio de luz a) corte transversal donde se observa el deterioro por hongos de podredumbre blanda; b) hifas que siguen la dirección de las microfibrillas.

Durante la tercera inspección, realizada a los 20 meses los resultados de la inspección fueron los que se muestran en el Cuadro N° 3. Si bien hay un mayor deterioro en las probetas, microscópicamente se observan los mismos patrones de deterioro que en la evaluación anterior. Se suma en las probetas control la aparición de degradación por hongos de pudrición blanca, que atacan la laminilla media lo que provoca en estado avanzado de deterioro a la separación de las células (figura 2). Tampoco hay indicios de la presencia de insectos.

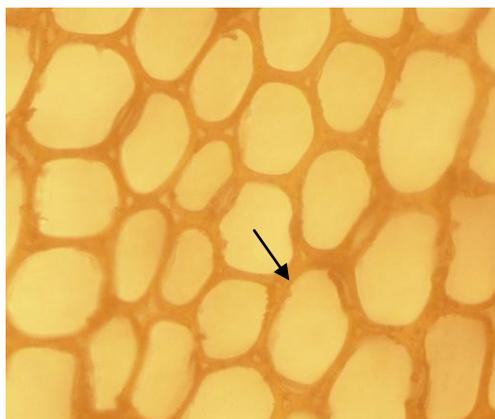


Figura 2: corte transversal donde se observa degradación por hongos de pudrición blanca.

Cuadro N°3 Calificación de las estacas de cada tratamiento según el grado de deterioro

Tratamiento/Clasificación	0	1	2	3	4
A1	1	2	1	1	0
A2	3	1	1	0	0
A3	4	1	0	0	0
B1	3	2	0	0	0
B2	2	0	2	1	0
B3	4	1	0	0	0
C1	4	1	0	0	0
C2	1	2	2	0	0
C3	5	0	0	0	0
D1	2	1	2	0	0
D2	3	1	0	1	0
D3	3	2	0	0	0
E	3	1	1	5	0
F	8	2	0	0	0
G	10	1	0	0	0

No hubo probetas que calificaran como 4. Solo el tratamiento C3 tuvo calificación 0 en sus 5 repeticiones lo cual lo hace hasta el momento el mejor tratamiento en el ensayo, puesto que su valor promedio ponderado es cero y no presenta ninguna variabilidad, no se lo incluyó en el análisis estadísticos.

La escala ordinal utilizada califica con un mayor puntaje el peor desempeño, por ello en el análisis, las medias de los puntajes obtenidos son mayores cuando el tratamiento tuvo peor

desempeño. En el cuadro 4 se muestran las medias de los puntajes obtenidos por cada tratamiento.

Cuadro N° 4 Medias de puntaje por tratamiento

Tratamiento	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	D1	D2	D3	E	F	G
Media de puntaje	1.4	0.6	0.2	0.4	1.4	0.2	0.2	1.2	1.0	0.8	0.4	2	0	0.09091

El análisis de varianza indica que el efecto de los tratamientos es significativo ($Pr < 0.0001$)

El análisis de estimadores de los efectos se presenta en el Cuadro N° 5

Cuadro N°5 Estimación de los efectos de los diferentes tratamientos, error estándar del estimador, valor de Chi-cuadrado y significancia de la prueba de hipótesis “el efecto del tratamiento es cero”.

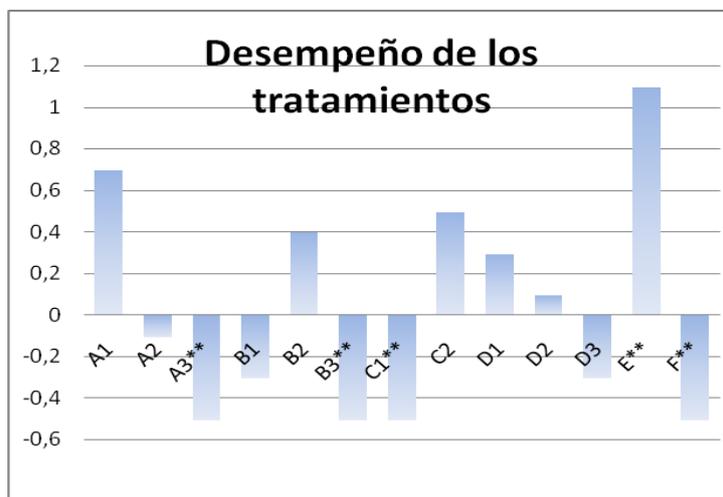
		Error			
	Estimador	estándar	χ^2	$Pr > \chi^2$	
Intercepto	0.7065	0.0892	62.73	<.0001	
Tratamiento	A1	0.6935	0.4316	2.58	0.1081
	A2	-0.1065	0.343	0.1	0.7562
	A3	-0.5065	0.1881	7.25	0.0071**
	B1	-0.3065	0.2216	1.91	0.1666
	B2	0.3965	0.5048	1.89	0.1695
	B3	-0.5065	0.1881	7.25	0.0071**
	C1	-0.5065	0.1881	7.25	0.0071**
	C2	0.4935	0.3224	2.34	0.1259
	D1	0.2935	0.3809	0.59	0.441
	D2	0.0935	0.491	0.04	0.849
	D3	-0.3065	0.2216	1.91	0.1666
	E	1.0935	0.3985	7.53	0.0061**
	F	-0.5065	0.1472	11.84	0.0006**

** efecto significativo

En el cuadro N°5 se ve que hay efectos de tratamientos que son iguales a cero (no significativos), menores que cero y significativos, aquellos tratamientos con mejor desempeño y mayores que cero y significativos, aquellos tratamientos de peor desempeño.

En el Gráfico N°1 se muestran los efectos estimados para cada tratamiento.

Gráfico N°1



En el Cuadro N° 6 se presentan los resultados del análisis de contrastes entre los efectos de los tratamientos y los tratamientos control.

Los tratamientos con mejor desempeño son A3, B3, C1 y F; los peores son A1 y E.

Cuadro N° 6 Análisis de contrastes entre algunos tratamientos; valores chi-cuadrado y significancia de la prueba de hipótesis de igualdad.

Contraste	GL	χ^2	Pr > χ^2
F vs G	1	0.51	0.4768
A1 vs E	1	0.42	0.5186
A2 vs E	1	4.74	0.0295
A3 vs E	1	12.31	0.0005
B1 vs E	1	8.75	0.0031
B2 vs E	1	0.34	0.5571
B3 vs E	1	12.31	0.0005
C1 vs E	1	12.31	0.0005
C2 vs E	1	1.25	0.2636
D1 vs E	1	1.90	0.1675
D2 vs E	1	2.23	0.1352
D3 vs E	1	8.75	0.0031
A1 vs F	1	6.43	0.0112
A2 vs F	1	1.11	0.2918

A3 vs F	1	0.00	1.0000
B1 vs F	1	0.63	0.4292
B2 vs F	1	4.74	0.0295
B3 vs F	1	0.00	1.0000
C1 vs F	1	0.00	1.0000
C2 vs F	1	7.81	0.0052
D1 vs F	1	3.64	0.0565
D2 vs F	1	1.25	0.2636
D3 vs F	1	0.63	0.4292
E vs F	1	13.33	0.0003
A1 vs G	1	7.95	0.0048
A2 vs G	1	1.91	0.1667
A3 vs G	1	0.30	0.5831
B1 vs G	1	1.72	0.1896
B2 vs G	1	5.80	0.0160
B3 vs G	1	0.30	0.5831
C1 vs G	1	0.30	0.5831
C2 vs G	1	10.29	0.0013
D1 vs G	1	4.93	0.0263
D2 vs G	1	1.80	0.1798
D3 vs G	1	1.72	0.1896
E vs G	1	15.92	<.0001
B1 vs A3	1	0.50	0.4795
A2 vs A3	1	1.00	0.3173
A2 vs B1	1	0.23	0.6336

Para las condiciones del experimento, no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos con el protector alternativo de referencia (F y G).

Los tratamientos que mostraron diferencias significativas con el blanco (E) y buen desempeño fueron A3, B3, C1, A2,F y G. Entre estos, A3, B3, C1 y F no se diferencian entre si, B1 y D3 forman otro grupo y A2 está solo.

Discusión

Hasta el momento de la tercera inspección, el tratamiento de prueba con mejores resultados es la solución en estudio con una concentración de Zn del 3% y el bórax aplicado por tratamiento de presión vacío presión (C3). Los tratamientos con 0,8% y 1,5% de Zn con el bórax agregado con vacío presión (A3 y B3) forman parte del primer grupo con buen desempeño y sin diferencias significativas con el preservante de referencia y por último el tratamiento con 6% de Zn y bórax aplicado con vacío presión (D3) es parte del segundo grupo con buen desempeño. Esto parece indicar que el tratamiento antilixivante aplicado con vacío presión es más efectivo. Si bien la formación *in situ* del borato de zinc se da superficialmente, con el tratamiento con vacío presión se logra una penetración algo mayor del borato en las probetas ya tratadas con Zn. De esta manera la protección externa en la madera es más

homogénea, profunda y queda en consecuencia más fijada en la misma en comparación con el tratamiento por pincelado, donde la capa de borato de zinc es más fina y está muy expuesta a roturas que sirven de entrada a los organismos xilófagos. A pesar de la mayor efectividad de los tratamientos antilixivantes con vacío presión, llevarlos a cabo empleando 2% en borax presenta muchas dificultades operativas por la rápida gelificación del sistema químico incluso dentro del autoclave. Además el tiempo de acondicionamiento requerido para tener las probetas tratadas adecuadas para el uso es muy extenso. Por estas razones es necesario estudiar una alternativa al orden de aplicación de los productos.

El tratamiento con 0,8% en Zn y sin tratamiento antilixivante (A1) fue el de peor desempeño, lo cual era de esperar ya que estas probetas están tratadas con soluciones de baja concentración en Zn que se lixivian fácilmente de la madera. Por otra parte en este ensayo las probetas alcanzan una retención menor a la misma concentración de solución en Zn que las empleadas en los ensayos de laboratorio frente a hongos descomponedores, donde también la madera estaba desprotegida (Ibañez et al. 2010, datos sin publicar).

Los tratamientos a 6% en Zn mostraron una menor eficiencia que aquellos con 3% en Zn. Este punto debe ser estudiado con más detalle ya que no hay problemas de especiación del metal en la solución a 6 %, su pH inicial era de 4,5 donde los metales están como Me^{2+} . Después de la impregnación el pH pasó a 5, lo que demuestra que no se afectó la disponibilidad del Zn. Sin embargo la disminución de la efectividad de la solución a 6 % se puede atribuir a dos causas. Por un lado la falta de los metales a nivel de trazas de la solución del reciclado en el tratamiento a 6% en Zn; por otro lado quizás no se ha llegado al límite de toxicidad del zinc en estas condiciones, que estaría a una concentración mayor al 6%.

El tratamiento con 1,5% en Zn y sin segundo tratamiento (B1), así como el tratamiento con 3% en Zn y sin segundo tratamiento (C1) aún mantienen su efectividad pero es muy posible que la pierdan en cuanto la lixiviación baje la concentración de Zn por debajo de la concentración mínima inhibitoria.

Los resultados de las futuras inspecciones determinarán si las tendencias observadas hasta el momento se mantienen y permitirán una evaluación más afinada de los tratamientos empleados.

Conclusiones

A 20 meses de instalado el cementerio de estacas, el tratamiento de la madera con una concentración de Zn del 3% y el bórax aplicado con presión vacío (C3) es el de mejores resultados.

Los tratamientos solo con Zn, sin proceso antilixivante posterior, son de resultados variables, dependientes de la concentración de Zn aplicada. La tendencia hasta el momento indica que el mejor tratamiento antilixivante con bórax es el aplicado por vacío y presión.

Agradecimientos

Los autores agradecen a ISUSA, Industrias Sulfúricas del Uruguay, por el apoyo económico que ha permitido llevar a delante esta investigación.

Al Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía UdelaR por el lugar de instalación del ensayo.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica, UdelaR , que financió el comienzo del ensayo.

Referencias

- AENOR. Norma: EN 252:1989, EN 252AC1:1989. Ensayo de campo para determinar la eficacia relativa de un protector de madera en contacto con suelo.
- Furuno T., Lin L., Katoh S. 2003. Leachability, decay, and termite resistance of wood treated with metabolates. *J. Wood Sci.* 49: 344 – 348
- Ibáñez C., Rabinovich M., Mantero C., Soubes M., y Cerdeiras M. 2005. Evaluación inicial de soluciones de sulfato de zinc obtenidas a partir de reciclado de pilas, como preservante para madera. *Proceedings de la X Reunión sobre Investigación y Desarrollo de Productos Forestales, International Academy of Wood Science, Concepción de Chile, Chile.*
- Ibáñez C., Rabinovich M., Kartal N., Mantero C., Cerdeiras M 2008a. Preservantes alternativos para madera obtenidos en un proceso de reciclado. *Revista Forestal Latinoamericana*, v. 023(1) 43 , p. 91-102.
- Ibáñez C., Rabinovich M., Mantero C., Ceccetto G., Cerdeiras M. 2008b. Wood preservative obtained by recycling, preliminary selection of leaching inhibitor. In: *International Research Group on Wood Preservation, 2008 Costa Rica.*
- Laks P., Manning M. 1995. Preservation of wood composites with zinc borate. IRG/WP 95-30074. *International Research Group on Wood Protection. Stockholm, Sweden.*

- Laks P., Manning M. 1997. Mobility of zinc borate wood composite preservative. IRG/WP 97 – 30153. International Research Group on Wood Protection. Stockholm, Sweden.
- Manning M. 2008. Borate wood preservatives: the current landscape. Chapter 26. Development of comercial wood preservatives. Efficacy, environmental, and health issues. ACS Symposium Series 982. Ed. by Schultz, Militz, Freeman , Goodell and Nicholas.
- Marney D.C., Russell L.J. 2008. Combined Fire Retardant and Wood Preservative Treatments for Outdoor Wood Applications – A Review of the Literature. Fire Technology 44: 1-14.
- Rainer J. B. 1993. Borates as wood preservatives - an environmental, health and safety perspective. International Research Group (IRG) on Wood Protection: Compendium 1969-2007.
- SAS Institute Inc. 2007. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.