

## Remoción del colorante triazoico Black 2-10 usando cepas de *Aspergillus tubingensis* sobreproductoras de glucosa oxidasa de peróxido de hidrógeno

J. Carlos Bautista-Bautista<sup>1</sup>, K. Valeria Cervantes-Delgado<sup>1</sup>, E. Paola Gámez-Fierro<sup>1</sup>, Pamela Romo-Rodríguez<sup>2</sup>, Fernando Santos-Escobar<sup>1</sup>, Marco I. Valle-Maldonado<sup>3</sup>, Víctor Meza-Carmen<sup>3</sup> y J. Félix Gutiérrez-Corona<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato; Guanajuato. Gto, 36050 México, cabo185@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Pabellón de Arteaga; Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México, [labromo@hotmail.com](mailto:labromo@hotmail.com)

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana, Morelia, Mich.

\* Autor de correspondencia: xilefgu@gmail.com tel. 4737320006 ext 8148

**Contaminación de agua, suelo y aire** (Tratamiento Biológicos).

**Palabras clave:** colorantes azoicos, *Aspergillus tubingensis*, glucosa oxidasa, decoloración

**Introducción.** Los colorantes azoicos son compuestos que tienen integrado un grupo azo (-N=N-) en su estructura, son ampliamente utilizados en el proceso de tinción de pieles por su estabilidad y esto ha provocado la contaminación de acuíferos por estos compuestos (Chang et al., 2000). Se ha reportado que microorganismos nativos de sitios contaminados tienen mayor capacidad de remover diferentes contaminantes. En el grupo de trabajo se aisló la cepa fúngica *Aspergillus tubingensis* Ed8 como nativa de un sitio contaminado con Cr(VI) y se ha observado que esta tiene la capacidad de reducir Cr(VI) a Cr(III) con muy poca incorporación de cromo a la biomasa; además, esta capacidad aumenta cuando la cepa crece en presencia de citrato (Coreño-Alonso et al., 2009). La cepa Ed8 tiene mayor actividad de la enzima GOX secretable, comparada con cepas de colección de *A. niger* y *A. tubingensis* (Romo-Rodríguez et al., 2015). En un estudio previo se obtuvieron 3 cepas derivadas de la cepa Ed8, transformadas con una construcción que contiene un módulo para la sobreexpresión del gen *goxC*. En el presente trabajo se caracterizaron dichas cepas molecularmente, así como respecto de la producción de peróxido de hidrógeno y la capacidad de remover el colorante triazoico Black 210.

**Materiales y métodos.** La cuantificación RT-Q-PCR para el análisis de la expresión del gen *goxC* se realizó usando una sonda de hidrolisis tipo TaqMan, y los niveles de expresión fueron determinados por el método matemático de  $\Delta\Delta Ct$  (Pfeffl., 2001). El número de copias del gen *goxC* integradas en el genoma se verificó por detección de Southern blot, usando oligonucleótidos marcados con biotina. La determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sobrenadante de cultivos se realizó espectrofotométricamente a 240 nm (Berris y Sizer., 1952), las lecturas obtenidas se interpolan en una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los cultivos para evaluar la remoción del colorante Black 2-10 se realizaron en medio LMM a pH 4.0 o 5.3, con 0, 25 y 45 mM de citrato. A los cultivos se agregó 200 mg/L del colorante Black 2-10 y después de 24 horas de incubación se determinó el porcentaje de decoloración por la ecuación de Leelakriangsak et al., 2012. Además, se determinó si las cepas utilizan el colorante como fuente de carbono en medio Vogel suplementado con 20 mg/L de colorante como fuente de carbono.

**Resultados.** Mediante análisis Southern blot se determinó que la cepa Ed8 tiene una copia del gen *goxC*, en tanto que las cepas transformantes DSB2 y DSB16 tienen dos copias y la cepa DSB27 tiene 3 copias. Los niveles de expresión del gen *goxC* en medio LMM sin citrato fueron apreciablemente mayores en las cepas transformantes DSB2 y DSB27, comparadas con las cepas Ed8 y DSB16. En las mismas condiciones el nivel de actividad GOX secretable y de producción de peróxido de hidrógeno durante el crecimiento fue alrededor de 2-2.5 veces mayor en las cepas DSB2 y DSB27, respecto de las cepas Ed8 y DSB16.

En medio sin citrato, tanto a pH 4.0 (Fig. 1 A) como a pH 5.3 (Fig. 1B) la cepa Ed8 muestra un mayor porcentaje (> 92 %) de remoción del colorante Black 2-10, comparada con las cepas transformantes DSB2, DSB16 y DSB27. Es notorio que esta última cepa transformante es la que menor capacidad de remoción muestra (alrededor de 60 % a pH 4 y de 80 % a pH 5.3). En medio con citrato la tendencia es la misma, con la excepción de la condición del medio de pH 5.3 con 25 mM de citrato (Fig. 1B), en el que la cepa transformante DSB16 muestra el mayor porcentaje de remoción del colorante (> 96 %), seguida de las cepas Ed8, DSB2 y DSB27, con 89 %, 86 % y 55 % de remoción, respectivamente. Es de resaltar que a pH 4.0 la cepa transformante DSB27 muestra una mejor capacidad de remoción del colorante en presencia de citrato (Fig. 1A). A pH 4 o a pH 5.0, las cepas Ed8, DSB2 y DSB16 superan la capacidad de decoloración de 100 mg/L de Black 2-10 reportada para la cepa SRS82 de *Providencia sp* (Agrawal y col., 2014). Todas las cepas mostraron capacidad de crecer en presencia del colorante cuando se utiliza como fuente de carbono.

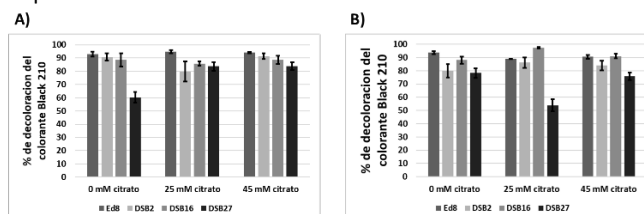


Figura 1: Gráficas de la capacidad decoloración del colorante Black 210 de las cepas Ed8, DSB2, DSB16 y DSB27 crecidas a diferentes concentraciones de citrato 0, 25 y 45 mM citrato. A diferentes pH A) pH 4.0, B) pH 5.3

**Conclusión.** En medio de pH 4 la remoción volumétrica del colorante Black 2-10 es menor en las cepas que sobre expresan el gen *goxC*. Todas las cepas utilizan el colorante como fuente de carbono para crecer.

### Bibliografía.

- Agrawal, S., Tripe, D., Patel, B., Dave, S., (2014) Optimization of triazo Acid Black 210 dye degradation by *Providencia sp.* SRS82 and elucidation of degradation pathway. *Process Biochemistry* 49: 110-119.
- Chang, J. S. and Y. C. Lin, (2000) Fed-Batch Bioreactor Strategies for Microbial Decolorization of Azo Dye using a *Pseudomonas luteola* Strain, *Biotechnol. Prog.*, 16, 979
- Coreño-Alonso, A., Acevedo-Aguilar, F.J., Reyna-López, G.E., Tomasini-Campocoso, A., Fernandez-Perrino, F.J., Wrobel, K., Wrobel, K., Gutiérrez-Corona, J.F., 2009. Cr(VI) reduction by an *Aspergillus tubingensis* strain: role of carboxylic acids and implications for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Chemosphere* 76, 43-47
- Romo-Rodríguez, P., Acevedo-Aguilar, F. J., López-Torres, A., Wrobel, K., Wrobel, K., y Gutiérrez-Corona, J. F. (2015). Cr (VI) reduction by gluconolactone and hydrogen peroxide, the reaction products of fungal glucose oxidase: Cooperative interaction with organic acids in the biotransformation of Cr (VI). *Chemosphere*. 134, 563-570.