



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA**

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE MIEMBROS DEL
GÉNERO *TRICHODERMA* A HIDROCARBUROS
POLIAROMÁTICOS**

ROSALBA ARGUMEDO DELIRA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO DE MÉXICO

FEBRERO, 2011

La presente tesis titulada: **Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos**, realizada por la alumna: **Rosalba Argumedo Delira**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR:

CONSEJERO: 

Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR: 

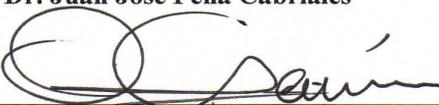
Dr. Daniel González Mendoza

ASESOR: 

Dr. Juan José Almaraz Suarez

ASESOR: 

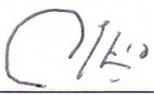
Dr. Juan José Peña Cabriales

ASESOR: 

Dr. Oscar García Barradas

ASESOR: 

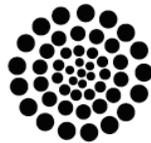
Dr. Jesús Samuel Cruz Sánchez

ASESOR: 

Dr. Mariano Martínez Vázquez

Montecillo, Estado de México
2011

Esta tesis fue financiada por los proyectos:



CONACYT

SEP-CONACYT 58594

SEP-CONACYT 79456



SUBNARGEM

SUBNARGEM 2009-2010

DEDICATORIA

ESTA TESIS QUIERO DEDICARLA A DIOS Y A LA VIRGEN DE
GUADALUPE QUE HAN SIDO MI LUZ DURANTE MI VIDA

A MI MAMÁ QUE SIEMPRE ESTA CONMIGO

A MI PAPÁ Y A MIS HERMANOS FRANCISCO, VIVIANA, JUDITH Y
CONCEPCIÓN

Y A MI SOBRINO YOSEPH MISAEAL

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi consejero de Tesis al Dr. Alejandro Alarcón por confiar en mí, y por todo su apoyo incondicional. Que ha sido un gran ejemplo para mí.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por su apoyo, y por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Microbiología de Suelos, para conocer a grandes personalidades del área.

Al Dr. Juan José Almaraz Suarez y al Dr. Jesús Pérez Moreno, por brindarme su gran apoyo en momentos difíciles, siempre les estaré agradecida.

Al Dr. Daniel González Mendoza, al Dr. Oscar Barradas, al Dr. Jesús Samuel Cruz, al Dr. Juan José Peña Cabriales y al Dr. Mariano Martínez Vázquez. Siempre les agradeceré el apoyo brindado para poder concluir con mi trabajo de tesis.

Al Dr. Mario Cobos Peralta y a Don Agustín por su ayuda brindada a esta tesis.

A la Dra. Remedios y a Susy por su ayuda brindada en esta tesis.

A la Dra. Eva Aguirre, a la Dra. Hortensia Rosas y a la Dra. Sandra Mora por ser siempre mis amigas.

Al M en C. Jaime Cruz por ser mi amigo

A todos mis amigos que son muchísimos, cada uno de ustedes me ha alentado a continuar superando: Violeta, Maribel, Ariadna, Esmeralda, Blanquita, Vivian, Claudia, Magda, Gaby, Alicia, Ángeles, Angélica, Alejandra, Elvia, Yesica, Cristina, Andrea, Yadira, Eric, Susy, Denisse, Elía, Lupita, Leo, Claudia R., Lourdes, Mónica, Maru, Estela, Maritza, Felipe, Jesús, Ernesto, Carlos, Luis, Víctor, Amalia, Jorge, Karina y Francisco. Mil gracias por su amistad y ayuda.

A Rosario, Don Mundo, Don Manuel, Don Fernando, Don Lorenzo y a Don Ramiro por su apoyo.

A la Licenciada Padilla y las muchachas que trabajan en la oficina de Servicios Académicos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	3
1.1.INTRODUCCIÓN	3
1.2.OBJETIVOS	4
1.2.1. Objetivo General	4
1.2.2. Objetivos Particulares	4
1.3.HIPÓTESIS	5
1.3.1. Hipótesis General	5
1.3.2. Hipótesis Específicas	5
CAPÍTULO II	
GENERALIDADES DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS Y DEL GÉNERO <i>TRICHODERMA</i>	6
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
2.1. INTERACCIÓN Y MECANISMOS DE LOS HONGOS CON COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS	8
2.2. ASPECTOS GENERALES DE <i>TRICHODERMA</i>	12
2.3. INTERACCIÓN DE <i>TRICHODERMA</i> CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS	16
2.3.1. Residuos lignocelulósicos	17
2.3.2. Plaguicidas, compuestos organoclorados, ácido acrílico, compuestos organofosforados, colorantes, hidrocarburos del petróleo y explosivos	19
2.4. INTERACCIÓN DE <i>TRICHODERMA</i> CON COMPUESTOS INORGÁNICOS	28
2.4.1. Elementos potencialmente tóxicos	29
2.4.2. Cianuro	32
2.5. APORTACIONES GENERADAS	34
CAPÍTULO III	

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ONCE CEPAS DEL GÉNERO <i>TRICHODERMA</i>	36
RESUMEN	36
ABSTRACT	37
3.1. INTRODUCCIÓN	38
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.2.1. Identificación morfológica de las once cepas fúngicas	40
3.2.1.1. Descripción macroscópica	40
3.2.1.2. Descripción microscópica	40
3.2.2. Caracterización molecular de las once cepas fúngicas	41
3.2.2.1. Extracción de ADN y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los iniciadores de <i>Trichoderma</i> de las once cepas fúngicas	41
3.2.2.2. Purificación y secuenciación de las cepas de <i>Trichoderma</i>	42
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.3.1. Identificación macroscópica y microscópica	42
3.3.2. Caracterización molecular	54
3.3.2.1. Extracción de ADN y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los iniciadores de <i>Trichoderma</i> de las once cepas fúngicas	54
3.3.2.2. Secuenciación	56
3.4. CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO IV	
TOLERANCIA DE ONCE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> A PETRÓLEO CRUDO, NAFTALENO, FENANTRENO Y BENZO[<i>a</i>]PIRENO	60
RESUMEN	60
ABSTRACT	61
4.1. INTRODUCCIÓN	62
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	64
4.2.1. Cepas de <i>Trichoderma</i>	64
4.2.2. Tolerancia de cepas de <i>Trichoderma</i> a petróleo crudo	65

4.2.3. Tolerancia de cepas de <i>Trichoderma</i> a naftaleno, fenantreno y benzo[<i>a</i>]pireno	65
4.2.4. Análisis estadístico	67
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.3.1. Tolerancia a petróleo crudo	67
4.3.2. Tolerancia a naftaleno y fenantreno	70
4.3.3. Tolerancia a benzo[<i>a</i>]pireno	79
4.3.4. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas fúngicas en presencia de nafatleno, fenantreno y benzo[<i>a</i>]pireno	84
4.4. CONCLUSIONES	90
CAPÍTULO V	
BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS POR <i>Trichoderma virens</i> Y <i>Trichoderma viride</i>	
	91
RESUMEN	91
ABSTRACT	92
5.1. INTRODUCCIÓN	93
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	94
5.2.1. Elección de un medio de cultivo líquido para las pruebas de degradación de hidrocarburos poliaromáticos	94
5.2.1.1. Medio mínimo sin fuente de carbono	94
5.2.1.2. Medio mineral con o sin fuentes de carbono y diferentes disolventes	95
5.2.2. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Inoculación con esporas y con micelio fúngico	96
5.2.2.1. Preparación del inóculo	96
5.2.2.2. Condiciones del cultivo	96
5.2.3. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Selección de una concentración apropiada de naftaleno, fenantreno y benzo[<i>a</i>]pireno	97
5.2.3.1. Preparación del inóculo	97
5.2.3.2. Condiciones del cultivo	97
5.2.4. Biodegradación de compuestos poliaromáticos por dos cepas de <i>Trichoderma</i>	98
5.2.4.1. Preparación del inóculo	98

5.2.4.2. Condiciones del cultivo	98
5.2.4.3. Determinación de de la cinética de consumo de glucosa en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno	99
5.2.4.4. Determinación de biomasa fúngica fresca, biomasa fúngica seca, proteínas fúngicas, consumo de glucosa, pH y porcentaje de degradación de los hidrocarburos poliarómicos	99
5.2.4.5. Determinación de parámetros cinéticos	101
5.2.4.6. Análisis estadístico	101
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
5.3.1. Elección de un medio de cultivo líquido para las pruebas de degradación de hidrocarburos poliarómicos.	102
5.3.1.1. Medio mínimo sin fuente de carbono	102
5.3.1.2. Medio mineral con o sin fuentes de carbono y diferentes disolventes	102
5.3.2. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliarómicos: Inoculación con esporas y con micelio fúngico	104
5.3.2.1. Biomasa fúngica seca	104
5.3.2.2. Biomasa fúngica fresca	105
5.3.2.3. Contenido de proteína fúngica	108
5.3.2.4. Efecto del pH	108
5.3.3. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliarómicos: Selección de una concentración apropiada de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno.	111
5.3.4. Biodegradación compuestos poliarómicos por dos cepas de <i>Trichoderma</i>	118
5.3.4.1. Cinética de consumo de glucosa en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno	118
5.3.4.2. Determinación de biomasa fúngica fresca, biomasa fúngica seca, proteínas fúngicas, consumo de glucosa, pH y degradación de hidrocarburos poliarómicos.	118
5.3.4.2.1. Biomasa fúngica fresca	119
5.3.4.2.2. Biomasa fúngica seca	120
5.3.4.2.3. Proteínas fúngicas	121
5.3.4.2.4. Consumo de glucosa	122

5.3.4.2.5. Efecto del pH	122
5.3.4.2.6. Degradación de hidrocarburos poliaromáticos	125
5.3.4.2.6.1. Degradación y acumulación de naftaleno	125
5.3.4.2.6.2. Degradación y acumulación de fenantreno	130
5.3.4.2.6.3. Degradación y acumulación de benzo[<i>a</i>]pireno	130
5.3.4.2.6.4. Determinación de parámetros cinéticos	132
5.3.5. Discusión	133
5.3.5.1. Elección de un medio de cultivo líquido para las pruebas de degradación de poliaromáticos.	133
5.3.5.2. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Inoculación con esporas y con micelio fúngico	135
5.3.5.3. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Selección de una concentración apropiada de naftaleno, fenantreno y benzo[<i>a</i>]pireno	137
5.3.5.4. Biodegradación de compuestos poliaromáticos por dos cepas de <i>Trichoderma</i>	138
5.4. CONCLUSIONES	148
CAPÍTULO VI	
INFLUENCIA DE NAFTALENO Y FENANTRENO EN EL METABOLISMO SECUNDARIO DE <i>Trichoderma virens</i> Y <i>Trichoderma viride</i>	
	149
RESUMEN	149
ABSTRACT	150
6.1. INTRODUCCIÓN	151
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	154
6.2.1. Preparación del inóculo	154
6.2.2. Condiciones de cultivo	154
6.2.3. Análisis de los tratamientos de las dos cepas de <i>Trichoderma</i> para la obtención de metabolitos secundarios	155
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
6.4. CONCLUSIONES	169
CAPÍTULO VII	

IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 EN <i>Trichoderma virens</i> Y <i>Trichoderma viride</i> EXPUESTAS A NAFTALENO, FENANTRENO Y BENZO[<i>a</i>]PIRENO	170
RESUMEN	170
ABSTRACT	171
7.1. INTRODUCCIÓN	172
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	174
7.2.1. Preparación del inóculo	174
7.2.2. Condiciones del cultivo	174
7.2.3. Extracción de ADN y corrimiento de PCR	175
7.2.4. Purificación y secuenciación de los productos de PCR	176
7.2.5. Extracción de RNA, conversión a cDNA y PCR	176
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	177
7.3.1. Extracción de ADN y PCR	177
7.3.2. Extracción de RNA, conversión a cDNA y PCR	180
7.4. CONCLUSIONES	186
CAPÍTULO VIII	
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DEL USO DE <i>TRICHODERMA</i> EN BIOTECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN	187
LITERATURA CITADA	189
ANEXO I	216
ANEXO II	219
ANEXOIII	221
ANEXO IV	223
ANEXO V	226
ANEXO VI	227

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Biodegradación de compuestos aromáticos en condiciones aeróbicas	11
Figura 2.2. Ruta de degradación para fenantreno por <i>Cunninghamella elegans</i>	11
Figura 2.3. Ruta de degradación para benzo[<i>a</i>]antraceno por <i>Cunninghamella elegans</i>	12
Figura 2.4. Metabolitos intermediarios formados durante la degradación aerobia de TNT por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . La 2,2',6,6'-tetranitro-4,4'-azoxitolueno y la 4-amino-2,6-dinitrotolueno se formaron durante la degradación de TNT por <i>Trichoderma viride</i>	28
Figura 2.5. Mecanismo enzimático que presenta <i>Trichoderma</i> spp. durante la degradación de cianuro	33
Figura 3.1. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP1 afín a <i>Trichoderma virens</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 µm	44
Figura 3.2. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP22 afín a <i>Trichoderma virens</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 µm	45
Figura 3.3. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP37 afín a <i>Trichoderma virens</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 µm	46
Figura 3.4. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP46 afín a <i>Trichoderma virens</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 µm	47
Figura 3.5. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP4 afín a <i>Trichoderma viride</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y	

	globosas observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	48
Figura 3.6.	Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP23 afín a <i>Trichoderma koningii</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales estrechas observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	49
Figura 3.7.	Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP38 afín a <i>Trichoderma harzianum</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas subglobosas y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	50
Figura 3.8.	Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP56 afín a <i>Trichoderma viride</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y globosas observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	51
Figura 3.9.	Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CP3 afín a <i>Trichoderma koningii</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales estrechas observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	52
Figura 3.10.	Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CPTGC afín a <i>Trichoderma viride</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y globosas observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	53
Figura 3.11.	Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> CPX afín a <i>Trichoderma atroviride</i> . A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento y D) esporas subglobosas observadas a las 96 h. Barras=10 μ m	54
Figura 3.12.	DNA obtenido de las once cepas de <i>Trichoderma</i> carril 1: marcador 1 kb (Fermentas®); carriles del 2 al 13: muestra de DNA de los aislamientos fúngicos en gel de agarosa al 1.0 %	55
Figura 3.13.	Productos de PCR de los aislamientos fúngicos, carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), carriles del 2 al 10: amplificaciones de los aislamientos fúngicos utilizando los iniciadores uTf y uTr para especies del género <i>Trichoderma</i> (500pb) en gel de agarosa al 1.0 %	55

- Figura 4.1. Tolerancia de *Trichoderma virens* (A-C) y *Trichoderma harzianum* (D-F) a petróleo crudo sobre el medio de cultivo, después de 96 h de incubación. A y D) crecimiento del hongo sin petróleo crudo (control), B y E) crecimiento del hongo en presencia de cuatro cuadros de papel filtro impregnados con petróleo crudo, y C y F) crecimiento del hongo en el medio de cultivo completamente cubierto con 1 mL de petróleo crudo 68
- Figura 4.2. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a 1 mL de petróleo crudo. Las cepas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) muestran una tendencia similar de tolerancia. El crecimiento de la cepa CP22 (*T. virens*) fue similar a la de su testigo (n=3, Media \pm error estándar) 69
- Figura 4.3. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a 1 mL de petróleo crudo. Las cepas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) muestran una tendencia un poco diferente de tolerancia. El crecimiento de las *Trichoderma* CP4 y CPTGC son casi iguales al de su control respectivo (n=3, Media \pm error estándar) 70
- Figura 4.4. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de naftaleno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) muestran diferente tolerancia a dicho hidrocarburo. El crecimiento de la cepa CP3 fue fuertemente afectado por el naftaleno (n=3, Media \pm error estándar) 72
- Figura 4.5. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de naftaleno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) muestran diferente tolerancia a dicho hidrocarburo. El crecimiento de la cepa CP23 fue fuertemente inhibido por el naftaleno (n=3, Media \pm error estándar) 73
- Figura 4.6. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de fenantreno en medio de cultivo mínimo. Las cepas fúngicas probadas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) mostraron un crecimiento similar en este hidrocarburo. La mayoría de las cepas fúngicas llenaron la caja a las 96 h (n=3, Media \pm error estándar) 74
- Figura 4.7. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de fenantreno en medio de cultivo mínimo. Las cepas fúngicas probadas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) mostraron un crecimiento similar en este

	hidrocarburo. La mayoría de éstas cepas fúngicas llenaron la caja después de las 120 h (n=3, Media ± error estándar)	75
Figura 4.8.	Inhibición de seis cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a concentraciones crecientes de naftaleno, evaluado a las 240 h en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar)	76
Figura 4.9.	Inhibición de cinco cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a dosis crecientes de naftaleno (240 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar)	77
Figura 4.10.	Inhibición de seis cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a concentraciones crecientes de fenantreno (72 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar)	78
Figura 4.11.	Inhibición de cinco cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a dosis crecientes de fenantreno (72 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar)	79
Figura 4.12.	Crecimiento de seis cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a seis concentraciones de benzo[a]pireno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CP1 (<i>T. virens</i>), CP37 (<i>T. virens</i>), CP38 (<i>T. harzianum</i>), CP46 (<i>T. virens</i>), CP22 (<i>T. virens</i>) y CP3 (<i>T. koningii</i>) muestran un crecimiento similar en presencia de este poliarómico. La mayoría de éstas llenaron la caja a las 96 h (n=3, Media ± error estándar)	81
Figura 4.13.	Crecimiento de cinco cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a seis concentraciones de benzo[a]pireno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CPX (<i>T. atroviride</i>), CP4 (<i>T. viride</i>), CPTGC (<i>T. viride</i>), CP23 (<i>T. koningii</i>) y CP56 (<i>T. viride</i>) muestran diferente tolerancia a dicho poliarómico. La mayoría de estas cepas de <i>Trichoderma</i> llenaron la caja a las 96 h (n=3, Media ± error estándar)	82
Figura 4.14.	Inhibición de seis cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a dosis crecientes de benzo[a]pireno (48 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar)	83
Figura 4.15.	Inhibición de cinco cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a dosis crecientes de benzo[a]pireno (48 h) en un medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar)	84
Figura 4.16.	Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a los tres poliarómicos (n=3, Media ± error estándar)	85
Figura 5.1.	A) biomasa fúngica fresca, B) biomasa fúngica seca y C) proteínas fúngicas de <i>Trichoderma virens</i> , producida en medio mínimo, medio mineral sin fuente de carbono, medio mineral con extracto de levadura, y medio mineral con glucosa, a los seis días de la inoculación (n=3, Medias ± error estándar)	103
Figura 5.2.	Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre la biomasa fúngica seca, en un medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L ⁻¹). Se evaluó cada 48 h (n=3,	

	Media \pm error estándar)	106
Figura 5.3.	Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre la biomasa fúngica fresca, en un medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L ⁻¹). Se evaluó cada 48 h (n=3, Media \pm error estándar)	107
Figura 5.4.	Efecto de inoculación (esporas o micelio) sobre las proteínas fúngicas, en un medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L ⁻¹). Se evaluó cada 48 h (n=3, Media \pm error estándar)	109
Figura 5.5.	Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre el pH del medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L ⁻¹). Se evaluó cada 48 h (n=3, Media \pm error estándar)	110
Figura 5.6.	Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en la biomasa fúngica seca de <i>Trichoderma virens</i> y <i>T. viride</i> , a las 144 h (n=3, Media \pm error estándar)	113
Figura 5.7.	Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en la biomasa fúngica fresca de <i>Trichoderma virens</i> y <i>T. viride</i> , a las 144 h (n=3, Media \pm error estándar)	114
Figura 5.8.	Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en la concentración de proteínas fúngicas de <i>Trichoderma virens</i> y <i>T. viride</i> , a las 144 h (n=3, Media \pm error estándar)	115
Figura 5.9.	Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en el pH del medio de cultivo inoculado con <i>Trichoderma virens</i> y <i>T. viride</i> , a las 144 h (n=3, Media \pm error estándar)	116
Figura 5.10.	Consumo de glucosa por <i>T. virens</i> y <i>T. viride</i> al ser expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L ⁻¹) en un medio líquido, evaluadas cada 24 h por once días (n=3, Media \pm error estándar)	119
Figura 5.11.	Biomasa fúngica fresca y seca de las cepas fúngicas expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L ⁻¹) en un medio líquido, evaluadas cada 48 h por seis días (n=3, Media \pm error estándar)	121
Figura 5.12.	Proteína fúngica y consumo de glucosa de las cepas fúngicas expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L ⁻¹) en un medio líquido, evaluadas cada 48 h por seis días (n=3, Media \pm error estándar)	123
Figura 5.13.	Comportamiento del pH de los medios de cultivo de crecimiento de dos cepas fúngicas expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L ⁻¹), evaluadas cada 48 h por seis días (n=3, Media \pm error estándar)	124
Figura 5.14.	Reducción de de la concentración inicial (100 mg L ⁻¹) de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en los controles abióticos debido a factores externos, evaluados cada 48 h	

por seis días (n=3, Media ± error estándar)	126
Figura 5.15. Reducción la concentración inicial (100 mg L ⁻¹) de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en los controles abióticos debido a las dos cepas de <i>Trichoderma</i> , evaluados cada 48 h por seis días (n=3, Media ± error estándar)	127
Figura 5.16. Por ciento de degradación de A) naftaleno, B) fenantreno y C) benzo[a]pireno por las cepas fúngicas de <i>Trichoderma</i> , evaluados cada 48 h por seis días (n=3, Media ± error estándar)	128
Figura 5.17. Acumulación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno por el micelio fúngico de dos cepas de <i>Trichoderma</i> , evaluada cada 48 h por seis días (n=3, Media ± error estándar)	129
Figura 5.18. Rendimiento de <i>T. virens</i> y <i>T. viride</i> expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno	131
Figura 5.19. Velocidad de crecimiento de <i>T. virens</i> y <i>T. viride</i> expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno	132
Figura 6.1. Cromatogramas del medio de cultivo extraído con acetona y liofilizado, correspondiente al cultivo de <i>Trichoderma virens</i> en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de incubación	156
Figura 6.2. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al control de <i>Trichoderma virens</i> a las 144 h de incubación	157
Figura 6.3. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al cultivo de <i>Trichoderma virens</i> en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de incubación	158
Figura 6.4. A) Cromatograma del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol de <i>Trichoderma virens</i> en presencia de fenantreno (100 mg L ⁻¹). B) Patrones de fragmentación de dos compuestos obtenidos en el medio de cultivo liofilizado de <i>T. virens</i> en presencia de fenantreno (100 mg L ⁻¹), extraído con metanol, a las 144 h de incubación	159
Figura 6.5. Cromatogramas del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona de <i>Trichoderma viride</i> en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de incubación	160
Figura 6.6. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al control de <i>Trichoderma viride</i> a las 144 h de incubación	162
Figura 6.7. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al cultivo de <i>Trichoderma viride</i> en presencia de naftaleno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de	

	incubación	163
Figura 6.8.	Cromatogramas del medio de cultivo extraído con metanol y liofilizado, correspondiente al cultivo de <i>Trichoderma viride</i> en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de incubación	164
Figura 6.9.	Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol, correspondiente al control de <i>Trichoderma viride</i> a las 144 h de incubación	165
Figura 6.10.	Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol, correspondiente al cultivo de <i>Trichoderma viride</i> en presencia de naftaleno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de incubación	166
Figura 6.11.	Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol, correspondiente al cultivo de <i>Trichoderma viride</i> en presencia de fenantreno (100 mg L ⁻¹), a las 144 h de incubación	167
Figura 7.1.	DNA de los hongos probados Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) DNA de <i>Trichoderma virens</i> , Carril 3) DNA de <i>Trichoderma viride</i> , Carril 4) DNA de <i>Cunninghamella elegans</i> , Carril 5) DNA de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Gel de agarosa al 1.0 %	178
Figura 7.2.	Productos de PCR de los cuatro hongos probados, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) amplificación del negativo (H ₂ O), Carril 3) amplificación de <i>Cunninghamella elegans</i> , Carril 4) amplificación de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , Carril 5) amplificación de <i>Trichoderma viride</i> y Carril 6) amplificación de <i>Trichoderma virens</i> . Gel de agarosa al 1.0 %	179
Figura 7.3.	Secuencias de nucleótidos conservados para el citocromo P450 en <i>Hypocrea virens</i> , donde se encuentran el iniciador reverso y el iniciador hacia delante	179
Figura 7.4.	Productos de PCR de <i>Trichoderma virens</i> expuesta a hidrocarburos poliaromáticos (100 mg L ⁻¹) a las 24 h, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) amplificación del negativo (H ₂ O), Carril 3) amplificación de <i>T. virens</i> (control), Carril 4) amplificación de <i>T. virens</i> expuesta a naftaleno, Carril 5) amplificación de <i>T. virens</i> expuesta a fenantreno, y Carril 6) amplificación de <i>T. virens</i> expuesta a benzo[<i>a</i>]pireno. Gel de agarosa al 1.0 %	180
Figura 7.5.	Productos de PCR de <i>Trichoderma virens</i> expuesta a dos concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos a las 24 h de crecimiento, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev.	

- Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) *T. virens* (control), Carril 3) *T. virens* expuesta a naftaleno (100 mg L^{-1}), Carril 4) *T. virens* expuesta a fenantreno (100 mg L^{-1}), Carril 5) *T. virens* expuesta a benzo[*a*]pireno (100 mg L^{-1}), Carril 6) *T. virens* expuesta a naftaleno (200 mg L^{-1}), Carril 7) *T. virens* expuesta a fenantreno (200 mg L^{-1}) y Carril 8) *T. virens* expuesta a benzo[*a*]pireno (200 mg L^{-1}) . Gel de agarosa al 1.0 % 181
- Figura 7.6. Productos de PCR de *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos a las 48 h de crecimiento, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) *T. virens* (control), Carril 3) *T. virens* expuesta a naftaleno (100 mg L^{-1}), Carril 4) *T. virens* expuesta a fenantreno (100 mg L^{-1}), Carril 5) *T. virens* expuesta a benzo[*a*]pireno (100 mg L^{-1}), Carril 6) *T. virens* expuesta a naftaleno (200 mg L^{-1}), Carril 7) *T. virens* expuesta a fenantreno (200 mg L^{-1}) y Carril 8) *T. virens* expuesta a benzo[*a*]pireno (200 mg L^{-1}) . Gel de agarosa al 1.0 % 181
- Figura 7.7. Unidades de expresión de citocromo P450 en *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno. A) cepa ante 100 mg L^{-1} y B) cepa ante 200 mg L^{-1} , evaluada a las 24 h. (n=3, Media \pm desviación estándar) 183
- Figura 7.8. Unidades de expresión de citocromo P450 en *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno. A) cepa ante 100 mg L^{-1} y B) cepa ante 200 mg L^{-1} , evaluada a las 48 h. (n=3, Media \pm desviación estándar) 184
- Figura 8.1. Mecanismos propuestos para la detoxificación de naftaleno fenantreno y benzo[*a*]pireno por *Trichoderma virens*, incluyendo la actividad del citocromo P450 en la degradación de HPA 188

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Capacidad de degradación de hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en el aceite combustible que tienen algunas especies del género <i>Trichoderma</i>	24
Cuadro 2.2. Capacidad de degradación de benzo[<i>a</i>]pireno por algunas especies de hongos	26
Cuadro 2.3. Concentraciones inhibitorias de algunos metales para el crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp.	31
Cuadro 3.1. Afinidad taxonómica de las once cepas evaluadas de acuerdo a sus caracteres morfológicos	43
Cuadro 3.2. Afinidad taxonómica y homología genética (comparación de sus secuencias en el Gen Bank) de las once cepas de estudio	56
Cuadro 4.1. Claves y lugar de procedencia de once aislamientos fúngicos	65
Cuadro 4.2. Estimulación del crecimiento de algunas cepas de <i>Trichoderma</i> expuestas a diferentes dosis de benzo[<i>a</i>]pireno con respecto al crecimiento del testigo	80
Cuadro 4.3. Tolerancia de once cepas de <i>Trichoderma</i> a petróleo crudo, naftaleno, fenantreno y benzo[<i>a</i>]pireno	89
Cuadro 6.1. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género <i>Trichoderma</i>	152
Cuadro 6.2. Datos cromatográficos de los tratamientos de <i>Trichoderma virens</i>	156
Cuadro 6.3. Datos cromatográficos de los tratamientos de <i>Trichoderma viride</i>	161

Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos

Rosalba Argumedo Delira, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*. Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar diversas enzimas que se han aprovechado en procesos industriales. Además, este grupo fúngico es importante para las plantas, al contribuir en el control de organismos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas. Por otro lado, las especies del género *Trichoderma* son capaces de acumular metales pesados, degradar cianuro, hidrocarburos de petróleo, colorantes, plaguicidas, compuestos organoclorados, etc. Sin embargo estos estudios son mínimos y en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos de detoxificación y los procesos enzimáticos involucrados. Esta investigación tuvo como objetivo general identificar algunos de los mecanismos que emplean los hongos del género *Trichoderma* para la detoxificación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA). Para cumplir con este objetivo, se plantearon diferentes fases experimentales: 1) identificar morfológicamente y molecularmente las once cepas de *Trichoderma* utilizadas en la investigación, 2) seleccionar las cepas de *Trichoderma* altamente tolerantes a petróleo crudo, naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno, 3) evaluar la eficiencia de degradación de dos cepas de *Trichoderma* seleccionadas en la prueba de tolerancia a la presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno, 4) evaluar el efecto de naftaleno y fenantreno en el metabolismo secundario de dos cepas de *Trichoderma* y finalmente, 5) evaluar la expresión del citocromo P450 en dos cepas de *Trichoderma* expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno. De los once aislamientos fúngicos, cuatro pertenecen a *T. virens*, tres a *T. viride*, dos a *T. koningii*, uno a *T. harzianum* y uno a *T. atroviride*. Las once cepas de *Trichoderma* difirieron en su tolerancia y crecimiento en medio de cultivo contaminado con petróleo crudo, naftaleno, fenantreno y/o benzo[*a*]pireno. La exposición de los hongos a dosis crecientes de naftaleno inhibió el crecimiento de todas las cepas de *Trichoderma* en comparación con los efectos provocados por dosis crecientes de fenantreno y benzo[*a*]pireno. Se encontraron cuatro cepas prominentes de *Trichoderma*: CP1 (*T. virens*), CP4 (*T. viride*), CP37 (*T. virens*), y CPX (*T. atroviride*) con alta tolerancia a compuestos poliaromáticos. La cepa fúngica CP4 (*T. viride*) mostró mayores porcentajes de degradación de HPA en comparación con la cepa fúngica CP1 (*T. virens*). La degradación de naftaleno fue de 55 y 40%, la degradación de fenantreno fue de 39 y 31% y la degradación de benzo[*a*]pireno fue de 61 y 31% por las cepas CP4 y CP1, respectivamente. El naftaleno y fenantreno modificaron la producción de metabolitos secundarios en la cepa CP4, mientras que la cepa CP1 no presentó muchos cambios. La expresión del citocromo P450 varió en función del HPA, concentración y tiempo de evaluación en la cepa fúngica CP1 (*T. virens*). Los resultados muestran algunos mecanismos de detoxificación de dos cepas de *Trichoderma* (CP1 y CP4) frente a HPA, además de su aplicación potencial en biotecnologías de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos poliaromáticos.

Palabras clave: *Trichoderma*, tolerancia, citocromo P450, naftaleno, fenantreno, benzo[*a*]pireno

Physiological response of members of the *Trichoderma* genus to polyaromatic hydrocarbons

Rosalba Argumedo Delira, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

The species of *Trichoderma* are a group of filamentous fungi belonging to Mycetozoa Kingdom (Fungi), Eumycota Division, Ascomycotina Subdivision, Euascomycete Class, Hypocreales Order, Hypocreaceae Family, and *Trichoderma* or *Hypocrea* genera. These fungi are predominant in terrestrial and aquatic ecosystems. The member of the genus *Trichoderma* has the potential to synthesize and release several enzymes for industrial utilization. Besides, this fungal group is important for plants since they may contribute on the control of plant pathogens due to its mycoparasitic and antibiotic capabilities. On the other hand, *Trichoderma* species are able to accumulate heavy metals, and to degrade cyanide, petroleum hydrocarbons, dyes, pesticides, chlorinated compounds, etc. However, those studies are scarce and in most of the cases, the involved detoxification mechanisms and the enzymatic processes remain unknown. The aim of this research was to identify some mechanisms utilized by *Trichoderma* fungal species for detoxifying polyaromatic hydrocarbons (PAH). Thus, five experimental phases were set: 1) Morphological and molecular identification of the eleven fungal strains used in this research; 2) Selection of *Trichoderma* strains with high tolerance to crude oil, naphthalene, phenanthrene, and benzo[a]pyrene; 3) Evaluation of two selected *Trichoderma* strains on their efficiency for degrading either naphthalene, phenanthrene, or benzo[a]pyrene; 4) Evaluation of the influence of naphthalene and phenanthrene on the secondary metabolism of two selected fungal strains; and 5) Evaluation of the cytochrome P-450 expression in two *Trichoderma* strains exposed to naphthalene, phenanthrene, and benzo[a]pyrene. From the eleven fungal strains, four of them belonged to *Trichoderma virens*, three to *T. viride*, two to *T. koningii*, one to *T. harzianum*, and one to *T. atroviride*. The eleven fungal strains showed variation on their tolerance and growth under contaminated-culture media with crude oil, naphthalene, phenanthrene, or benzo[a]pyrene. The exposure to increasing doses of naphthalene resulted in growth inhibition for all *Trichoderma* strains in comparison to the effects due to increasing doses of phenanthrene or benzo[a]pyrene. Four *Trichoderma* strains with high tolerance to the three PAH were characterized: CP1 (*T. virens*), CP4 (*T. viride*), CP37 (*T. virens*), and CPX (*T. atroviride*). The fungal strain CP4 (*T. viride*) showed higher degradation percentages of PAH than the strain CP1 (*T. virens*): naphthalene degradation was 55 and 40%, respectively, while degradation of phenanthrene was 39 and 31%, and for benzo[a]pyrene was 61 and 31%, respectively. The secondary metabolism of the CP4 strain was significantly modified by naphthalene or phenanthrene when compared to the CP1 strain. The expression of the cytochrome P450 for the CP1 strain (*T. virens*) depended on the type, dose and exposure time of PAH. Results show some detoxifying mechanisms for two *Trichoderma* strains (CP1 and CP4), and their potential application in bioremediation technologies directed to contaminated sites with PAH.

Key words: *Trichoderma*, tolerance, cytochrome P450, naphthalene, phenanthrene, benzo[a]pyrene

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

La contaminación es un problema que aqueja a nuestra sociedad puesto que diariamente se generan abundantes cantidades de residuos por causa de las actividades humanas, para tratar de mitigar la contaminación provocada por estos residuos se han generado diversas tecnologías.

Las tecnologías ambientales se basan en métodos químicos, físicos y biológicos; se mencionarán principalmente los métodos biológicos que consisten en la utilización de microorganismos y plantas (biorremediación). Se sabe mucho de las habilidades que presentan las bacterias y su uso en la biorremediación, y en menor medida de otros microorganismos como hongos, algas y protozoarios. En lo que respecta a los hongos filamentosos hay mucha información sobre ciertas especies tales como *Phanerochaete*, *Cunninghamella*, *Aspergillus*, *Penicillium* por mencionar algunas.

En contraste existe poca información con lo que respecta a especies del género *Trichoderma* y se sabe de manera muy general, que son capaces de biodegradar algunos plaguicidas e hidrocarburos del petróleo (Smith, 1995; Chaîneau *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2003). La mayoría de los estudios sobre el género *Trichoderma* están enfocados en el control biológico de hongos fitopatógenos y en la producción de enzimas útiles para la industria alimentaria y papelera.

Dentro de los hidrocarburos del petróleo se encuentran algunos compuestos poliaromáticos, moléculas orgánicas con una distribución ubicua y altamente recalcitrantes en el medio ambiente. La importancia de su estudio radica en que son sustancias que perjudican la salud humana pues son agentes cancerígenos, mutágenos y

teratógenos (Palhmann y Pelkonen, 1987; Manilal y Alexander, 1991; Toyooka y Ibuki, 2007). Los estudios acerca de tolerancia, degradación y enzimas involucradas en la degradación de compuestos poliaromáticos; específicamente para especies del género *Trichoderma* son casi nulos, por lo que este trabajo de investigación pretende evaluar estos aspectos. Con la finalidad de generar información útil para la implementación de especies del género *Trichoderma* en los procesos de biorremediación de sitios contaminados con compuestos poliaromáticos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Identificar algunos de los mecanismos que emplean los hongos del género *Trichoderma* para la destoxificación de compuestos poliaromáticos.

1.2.2. Objetivos Particulares

1. Identificar morfológicamente y molecularmente las cepas de *Trichoderma* a utilizar en la investigación.
2. Seleccionar cepas del género *Trichoderma* altamente tolerantes a petróleo crudo, naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.
3. Evaluar la eficiencia comparativa de degradación de dos cepas seleccionadas de *Trichoderma* en la prueba de tolerancia a la presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.
4. Evaluar el efecto de naftaleno y fenantreno en el metabolismo secundario de dos cepas de *Trichoderma*.
5. Evaluar la expresión de citocromo P450 en dos cepas de *Trichoderma* expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.

1.3. HIPÓTESIS

1.3.1. Hipótesis General

Los hongos del género *Trichoderma* son capaces de tolerar y degradar altas concentraciones de compuestos poliaromáticos.

1.3.2. Hipótesis Específicas

1. La técnica molecular empleada para la identificación taxonómica de especies de *Trichoderma* rechaza en un 70 por ciento la identificación morfológica de las especies.
2. Las cepas del género *Trichoderma* evaluadas no son tolerantes a todos los hidrocarburos poliaromáticos probados.
3. La tasa de degradación de compuestos poliaromáticos por las cepas seleccionadas de *Trichoderma* es mayor que 20%.
4. El metabolismo secundario de las dos cepas de *Trichoderma* seleccionadas es afectado por la presencia de compuestos poliaromáticos.
5. Las cepas seleccionadas de *Trichoderma* presentan diferente expresión del citocromo P450 cuando son expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS, Y DEL GÉNERO *TRICHODERMA*

RESUMEN

Las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. Sin embargo, los estudios sobre su comportamiento y su efecto en ambientes terrestres y acuáticos contaminados han sido escasamente estudiados. Esta revisión pretende hacer una compilación de toda la información actualizada disponible, respecto a la interacción de *Trichoderma* en presencia de contaminantes de origen orgánico (hidrocarburos del petróleo, explosivos y plaguicidas) e inorgánico (metales pesados y cianuro) con el fin de conocer el potencial de este grupo fúngico en la biorremediación de ambientes contaminados. No obstante, para tales fines, es necesario realizar investigaciones enfocadas en evaluar sus respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares ante diferentes tipos de contaminantes, y definir con ello su posible aplicación en los diferentes sistemas de biorremediación.

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos de petróleo, plaguicidas, metales pesados

CHAPTER II
GENERALITIES OF THE DEGRADATION OF POLYAROMATIC
COMPOUNDS, AND THE *TRICHODERMA* GENUS

ABSTRACT

The *Trichoderma* fungal species have been fully characterized due to their application to agriculture since they are important antagonists for several horticultural plant pathogens. In contrast, the behavior and the effects of these fungi at contaminated soils have been scarcely studied. This review compiles updated information about the interactions among *Trichoderma* species and organic (petroleum hydrocarbons, explosives, and pesticides) and inorganic (heavy metals and cyanide) pollutants in order to know their potential for remediating contaminated environments. Nevertheless, for such purposes, it is needed further experimental research based on applying *Trichoderma* species either to study their physiological, biochemical and molecular responses when exposed to several types of pollutants, or to assess their potential application into the several processes of bioremediation.

Key words: bioremediation, petroleum hydrocarbons, pesticides, heavy metals

2.1. INTERACCIÓN Y MECANISMOS DE LOS HONGOS CON COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS

A partir de la década de 1980 se propuso el empleo de hongos de pudrición blanca, como alternativa para realizar la decoloración de efluentes y para la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus* spp. son los hongos que tienen mayor potencial para ser empleados con estos fines (Sack *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1999; Iqbal y Saeed, 2007; Binupriya *et al.*, 2008). La capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO₂ y H₂O ofrece una alternativa indiscutible para su utilización en el tratamiento de contaminantes.

Dicho potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su capacidad adaptativa de crecer en diferentes ambientes (Field *et al.*, 1993). Esta habilidad les permite a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes sustratos y acceder a los compuestos que constituyen los contaminantes más frecuentes de los suelos (Martin-Moreno *et al.*, 2004).

La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de enzimas como citocromo P-450, lacasa, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa, permite que los hongos tengan una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con una estructura similar. Entre los diferentes compuestos xenobióticos que pueden ser transformados por hongos basidiomicetos, se encuentran fundamentalmente: plaguicidas, hidrocarburos aromáticos (benzo[*a*]pireno, fenantreno, pireno, etc.), compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas y bifenilos policlorados) y azocolorantes (Morgan *et al.*, 1991; Boyle *et al.*, 1998).

En los últimos años, los hongos de la pudrición blanca de la madera han sido utilizados para descontaminar suelos y aguas contaminadas con xenobióticos, por su especial capacidad para degradar este tipo de sustancias (Barr y Aust, 1994; Grey *et al.*, 1998; Juhasz *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado la capacidad de estos hongos para decolorar efluentes de la industria aceitera, textil y papelera (Fernando *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1992).

De igual forma se ha observado esa capacidad en tratamientos *in situ* de suelos contaminados por xenobióticos, como en el caso de *Phanerochaete sordida* (Lamar *et al.*, 1994). Otros grupos de hongos han demostrado la viabilidad de estos tratamientos, en condiciones naturales, depositando inóculos miceliales en el suelo, constatando la efectividad de los mismos al obtener reducciones de hasta 40% para diferentes moléculas de compuestos poliaromáticos (Lestan y Lamar, 1996).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) constituyen una gran diversidad de compuestos orgánicos y son generalmente descritos como moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos con una configuración estructural variada. Las propiedades químicas de estos compuestos que se encuentren en el ambiente dependen del tamaño de la molécula, el número de anillos aromáticos y de la topología molecular o de la unión de los anillos parentales.

Generalmente un incremento en el tamaño y angularidad en la molécula de los HPA tiene como resultado un incremento en su hidrofobicidad y estabilidad electroquímica. La estabilidad y la hidrofobicidad en las moléculas de los HPA son dos factores primarios que contribuyen a la persistencia de estos compuestos en el ambiente (Kanaly y Harayama, 2000).

Las rutas metabólicas que presentan los hongos durante la biodegradación de HPA involucra en primera instancia reacciones de oxidación que son llevadas a cabo por citocromo P-450 y monooxigenasas que dan como resultado la formación de un epóxido, posteriormente se forman hidroles e hidroquinonas (Sutherland, 1992; Cerniglia, 1997).

No todos los hongos son capaces de metabolizar compuestos poliaromáticos; sin embargo, algunos hongos emplean una serie de reacciones enzimáticas para oxidar y romper la molécula del poliaromático de tal forma que logra transformarlo en intermediarios para el ciclo de Krebs (metabolismo central, **Fig. 2.1**) (Díaz, 2004). Aunque los hongos no son capaces de utilizar a los HPA como única fuente de carbono y energía, tienen la habilidad de transformarlos bajo condiciones de cometabolismo (Lange *et al.*, 1994).

Cerniglia y Yang (1984) proponen una ruta de degradación para antraceno y fenantreno por *Cunninghamella elegans*, donde estas moléculas son sometidas a oxidaciones, primero formando epóxidos y después formando dioles (**Fig. 2.2**). Sutherland *et al.* (1991) proponen un mecanismo similar para *Phanerochaete chrysosporium*. Mientras que Cerniglia *et al.* (1994) propusieron una ruta de degradación para benzo- α -antraceno por *Cunninghamella elegans* (**Fig. 2.3**), donde los intermediarios que se forman son epóxidos y compuestos hidroxilados.

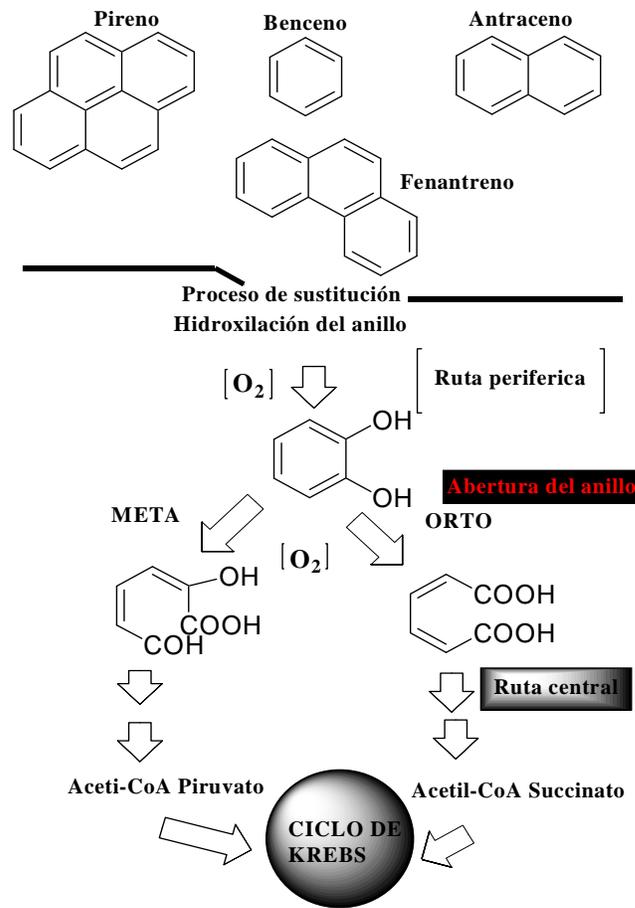


Figura 2.1. Biodegradación de compuestos aromáticos en condiciones aeróbicas (Díaz, 2004).

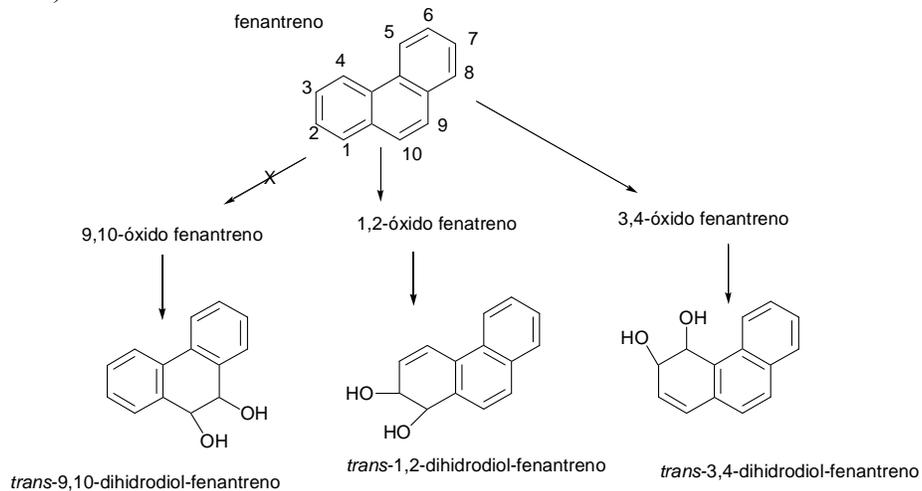


Figura 2.2. Ruta de degradación para fenantreno por *Cunninghamella elegans* (Cerniglia y Yang, 1984).

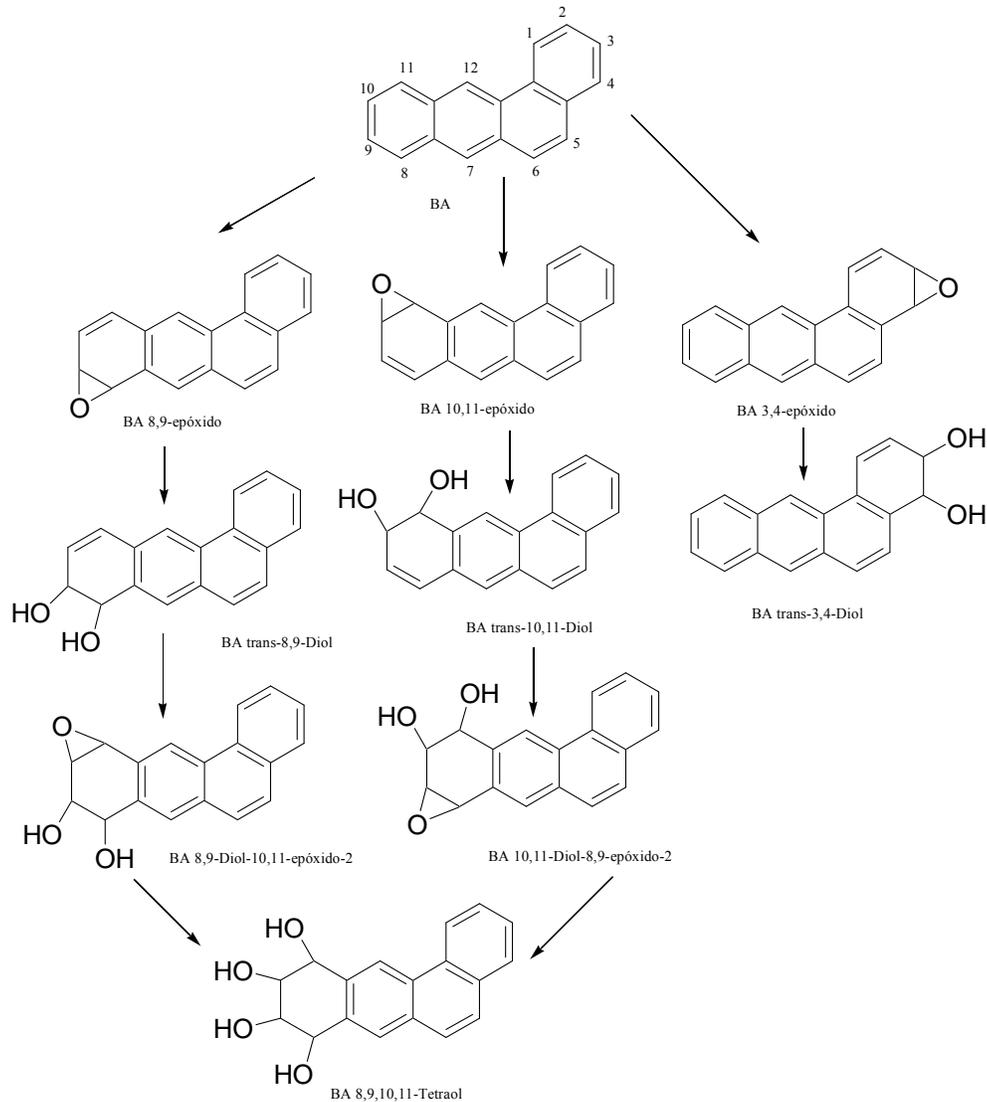


Figura 2.3. Ruta de degradación para benzo[a]antraceno por *Cunninghamella elegans* (Cerniglia *et al.*, 1994).

2.2. ASPECTOS GENERALES DE *TRICHODERMA*

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetae (fungi), División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Hyphales (Moniliales) y Familia Moniliaceae (Alexopoulos y Mims, 1979; Subramanian, 1983). Aunque de acuerdo con

Lieckfeldt *et al.* (1999), Samuels y Chaverri (2003), Samuels (2005) y Jaklitsch *et al.* (2006), la clasificación taxonómica del género *Trichoderma* sería Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*.

Sin embargo, la taxonomía del género es aún problemática ya que la mayoría de los estudios están basados en la morfología, por lo que se intenta tener una unificación entre la taxonomía basada en técnicas moleculares y la taxonomía basada en aspectos morfológicos del género *Trichoderma* (Kuhls *et al.*, 1997; Lieckfeldt *et al.*, 1999). Estos hongos se caracterizan por ser el constituyente predominante de los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005).

Algunas especies se caracterizan por ser de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, con excepción de algunas especies que son además, micoparásitas como *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. viride* y *T. virens* (Williams *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006). Además estos hongos presentan la habilidad de colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett, 1991b; Harman *et al.*, 2004). Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la presencia de materia orgánica y humedad, y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 25 a 30 °C (Papavizas, 1985). Sin embargo, se ha encontrado que pueden adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin, 1988; Jackson *et al.*, 1991).

De manera particular, los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizosfera, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Además, este grupo fúngico es importante para las plantas, al

contribuir en el control de organismos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes en el control biológico de hongos causantes de enfermedades para diferentes plantas hortícolas (Score y Palfreyman, 1994; Druzhinina y Kubicek, 2005; Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007). Las cepas de *Trichoderma* más comercializadas para el control biológico son *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*; esta última especie fúngica es la más utilizada y reportada en la literatura (Harman, 2000; Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007).

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar diversas enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas. Esta capacidad enzimática se ha aprovechado en procesos industriales (Kubicek y Harman, 1998; Verma *et al.*, 2007). La explotación comercial de estas enzimas es diversa, ya que se emplean para producir detergente para ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Reese y Mandels, 1989; Galante *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1993; Verma *et al.*, 2007). Las celulasas de *T. reesei* se utilizan en el blanqueo de pulpa de papel, que provee una alternativa amigable al convencional blanqueo con cloro. Los efluentes generados del blanqueo con cloro constituyen un problema ambiental por los hidrocarburos clorados formados durante dicho proceso (Buchert *et al.*, 1994). Además, las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios, dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina (Brian, 1944; Di Pietro *et al.*, 1993) y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Kleifeld y Chet, 1992). *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma* spp. son capaces de incrementar el crecimiento de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.)

en más de un 30 y 26% respectivamente (Lynch *et al.*, 1991; Ousley *et al.*, 1994). Gravel *et al.* (2007) probaron la capacidad de *T. atroviride* para promover el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Este hongo fue capaz de producir ácido indol acético en un medio con L-triptofano, triptamina y triptofol. Por otra parte, *Trichoderma* sp. ha sido utilizada en la industria de los aromatizantes ya que al aplicarlo con aceites vegetales comerciales (aceite de ricino, aceite de avellana, aceite de uva y aceite de linaza), el hongo produce el metabolito 6-pentil- α pirona que proporciona el aroma de coco (Bonnarme *et al.*, 1997).

Los antecedentes mencionados resaltan la importancia y los efectos benéficos que tienen las especies de *Trichoderma* para la producción agrícola y para la industria (Esposito y Da Silva, 1998). Sin embargo, los estudios relacionados con la interacción de este género fúngico con los contaminantes presentes en el suelo han recibido limitada atención. Por lo anterior, el presente capítulo se enfoca a la revisión de las respuestas de los hongos del género *Trichoderma* ante la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos, con el fin de evaluar su potencial como agente biológico aplicado a los sistemas de biorremediación. El Biotechnology and Biological Sciences Research Council BBSRC (1999), menciona que la biorremediación consiste en la eliminación, atenuación o transformación de los contaminantes por medio de procesos biológicos. Así como en la remediación fitobial, que combina la fitorremediación y la biorremediación (Lynch y Moffat, 2005), en donde las cepas de *Trichoderma* pueden ser inoculadas a diferentes tipos de plantas utilizadas en la fitorremediación. Es importante mencionar que el empleo de técnicas genéticas puede incrementar la capacidad del género *Trichoderma*, para degradar contaminantes de origen orgánico e inorgánico, al injertarles genes de otros

organismos con un alto poder de degradación de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Por otro lado, los marcadores genéticos de fluorescencia y luminiscencia son herramientas utilizadas por muchos laboratorios, para cuantificar o detectar poblaciones *in situ* específicas de células y actividades de genes en muestras complejas de suelo o material vegetal (Jansson, 2003). Otra aplicación importante de estos marcadores genéticos es como biosensores de contaminantes, tal es el caso de *Pseudomonas* bioluminiscentes, usada para monitorear naftaleno (Sayler *et al.*, 2001); otro ejemplo es la construcción de un biosensor para la detección de derivados monosustituidos de benceno en soluciones acuosas, a partir de él gen reportero *gfp* y de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* A506 (Willardson *et al.*, 1998; Stiner y Halverson, 2002). La construcción de biosensores a partir de especies del género *Trichoderma* y marcadores genéticos de fluorescencia y luminiscencia podrían ser de gran utilidad en el monitoreo de sitios contaminados.

2.3. INTERACCIÓN DE TRICHODERMA CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Las sustancias orgánicas están formadas de carbono, hidrógeno y oxígeno, principalmente. Algunos ejemplos de compuestos orgánicos son los terpenos, los ácidos grasos, las proteínas, los carbohidratos, los ácidos nucleicos, así como algunos compuestos contaminantes como los hidrocarburos del petróleo, los plaguicidas y los colorantes.

De manera específica, la forma en que un microorganismo interactúa con un contaminante de naturaleza orgánica, es diferente a la de un contaminante de origen

inorgánico (Shannon y Unterman, 1993). Los microorganismos pueden transformar los contaminantes orgánicos, en compuestos que presenten menor o mayor toxicidad, con respecto al compuesto original. En contraste, algunos microorganismos pueden degradar completamente los contaminantes orgánicos, lo que implica su completa mineralización hasta compuestos inocuos como agua y dióxido de carbono (Alexander, 1981). En los siguientes apartados, se mencionan las interacciones de hongos del género *Trichoderma* con diferentes contaminantes de origen orgánico.

2.3.1. Residuos lignocelulósicos

Del total de los residuos generados por las ciudades, el 40% de ellos son de origen celulósico o lignocelulósico. La industria papelera contribuye, en buena medida, a la generación de este tipo de residuos (Weil *et al.*, 1994; van Wyk, 2001a,b). Ante la problemática ambiental que representan estos residuos, se están proponiendo y aplicando nuevas técnicas biotecnológicas para favorecer la degradación y mineralización de estos residuos celulósicos.

Una de estas biotecnologías se basa en la aplicación de hongos filamentosos, pues se sabe que varios de ellos juegan un papel muy importante en los procesos de biodegradación natural de materiales lignocelulósicos, debido a las enzimas celulolíticas que poseen (Olsson *et al.*, 2003; Pečiulytė, 2007). Las especies de *Trichoderma* son capaces de degradar carbohidratos derivados de la madera especialmente celulosa y hemicelulosa, por esta razón las enzimas nativas de *Trichoderma* son empleadas para la hidrólisis y modificación específica de fibras de celulosa para diferentes propósitos en la industria papelera (Kubicek *et al.*, 1993). Las celulasas derivadas de *T. viride*, *T. reesei* y

Penicillium funiculosum han logrado bioconvertir residuos papeleros en azúcares fermentables. Sin embargo, la efectividad de estas enzimas es dependiente de la composición de los diferentes residuos, ya que no es la misma para el papel de oficina, papel periódico y el papel filtro (van Wyk, 1999; van Wyk, 2001a,b; van Wyk y Mohulatsi, 2003). Mokeev *et al.* (1998) utilizaron hongos del género *Trichoderma* para biodegradar la celulosa radiactiva (algodón que es contaminado con radionucleidos) proveniente de residuos de la industria textil. Itävaara *et al.* (1999) probaron la biodegradabilidad de diferentes materiales de celulosa empleando endoglucanasa I y II de *T. reesei* y β -glucosidasa de *Aspergillus niger*. Los resultados de biodegradabilidad indican que la mayoría de los materiales de celulosa generan más del 70% de dióxido de carbono, en cambio la biodegradabilidad de la celulosa altamente modificada y del acetato de celulosa es inferior al 10%. Sin embargo, la degradación de residuos de celulosa por celulasas, muestra algunas desventajas como el bajo rendimiento enzimático, la baja actividad específica y la inhibición enzimática debida a subproductos finales como la celobiosa, ya que *Trichoderma* es deficiente en β -glucosidasa (Durand *et al.*, 1988; Zaldívar *et al.*, 2001).

Como se puede apreciar, el potencial de las especies del género de *Trichoderma* en la degradación de residuos de origen ligninolítico y celololítico es amplio, y puede ser incrementado empleando técnicas genéticas. Un ejemplo claro es el de las especies mutantes de *Trichoderma* sp., *T. viride*, *T. reesei* y *T. longibrachiatum* que han mostrado ser grandes productoras de celulasas y poderosas destructoras de celulosa cristalina (Schulein, 2000; Szengyel *et al.*, 2000).

2.3.2. Plaguicidas, compuestos organoclorados, ácido acrílico, compuestos organofosforados, colorantes, hidrocarburos del petróleo y explosivos.

Los plaguicidas son un foco de contaminación generado por las actividades agrícolas, cuyo mal manejo y persistencia provoca la contaminación de mantos acuíferos, suelo e incluso alimentos (Chiron *et al.*, 2000; Sun y Chen, 2008). Lo anterior puede potencialmente causar alteraciones en el ambiente y la salud humana, debido a que estas sustancias pueden ser bioacumuladas y biomagnificadas durante la cadena alimenticia (Harrison *et al.*, 1998; Binelli y Provini, 2004; Li *et al.*, 2008).

Con base en su diferente composición y estructura química, la biodegradación de estas sustancias depende de la complejidad y estabilidad de la molécula del plaguicida. El 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (DDT) es un plaguicida que permanece en la naturaleza durante un tiempo excesivamente largo. Así, el DDT se identifica como un insecticida de alta persistencia con una vida media mayor a 100 días, aunque por ejemplo, en algunos bosques su vida media llega a ser de 20 a 30 años (Mitra y Raghu, 1998). Sin embargo, *P. chryosporium* es capaz de transformarlo enzimáticamente al inducir la deshalogenación vía procesos aerobios (Paszczynski y Crawford, 1995). Bumpus y Aust (1987) demostraron la desaparición y la mineralización de DDT en cultivos deficientes de nitrógeno, además encontraron la formación de 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDD), 2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol (dicofol), 2,2-dicloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol y 4,4-diclorobenzofenona (DBP) como metabolitos de degradación.

Varias especies de *Trichoderma* son capaces de degradar plaguicidas, debido al poder enzimático que poseen. Esta capacidad bioquímica permite vislumbrar el potencial de aplicación de *Trichoderma* en la biorremediación de sitios contaminados con

plaguicidas teniendo con ello una relevancia ecológica (Matsumura y Bousch, 1968; Smith, 1995).

Das *et al.* (2003) mencionan que el forato estimula el crecimiento de *Trichoderma* sp. mientras que ante carbofurano su comportamiento es similar al del testigo. Ambos insecticidas tienen un tiempo de persistencia corto en la rizosfera de aproximadamente 10.4 y 9.1 días, respectivamente. *Trichoderma viride* fue crecida durante 10 días en presencia de Trifluralina (1 mg L^{-1}) que es un herbicida de uso común, extrayéndose menos del 10% del herbicida (Zayed *et al.*, 1983).

En contraste, se ha observado que las especies *T. harzianum* y *T. longipilus* son sensibles al herbicida fosfinotricina cuando se aplica a una concentración de 1 mM (Ahmad y Malloch, 1995). Anderson y Domsch (1976) mencionan que la degradación del herbicida Arvadex (2.5 mg L^{-1}) por *T. harzianum* es muy lenta en cultivo líquido, la cual fue menor al 20% después de 10 días de incubación.

La mayoría de los plaguicidas organoclorados son persistentes en la naturaleza y presentan alta toxicidad, como el DDT, el dieldrin y el endosulfan. No obstante se ha documentado que *Trichoderma* es capaz de degradar estos tres plaguicidas. (Bixby *et al.*, 1971; Kutz *et al.*, 1991; Hay y FoCht, 1998; Snedeker, 2001). Los principales metabolitos de biodegradación de endosulfan por *T. harzianum* son el sulfato de endosulfan y el diol de endosulfan, que se generan por la acción de un sistema enzimático oxidativo; lo cual sugiere que la enzima hidrolítica sulfatasa es la responsable indirecta de la formación del diol de endosulfan al efectuar la hidrólisis del sulfato de endosulfan (Katayama y Matsumura, 1993; Mukherjee y Mittal, 2005).

Una de las actividades industriales cuyas descargas causan efectos adversos en el ambiente es la industria de la celulosa (Sponza, 2003). Esta se caracteriza por el uso de cloro y dióxido de cloro en el proceso de blanqueo de la pulpa de papel (Stinchfield y Wood, 1995). En este proceso se generan diversos compuestos organoclorados descritos como altamente tóxicos, entre ellos se encuentran 4,5-dicloroguaiacol, 3,4,5-tricloroguaiacol, 4-etil-2-metoxifenol, pentaclorofenol, 2,3,5,6-tetracloro-4-metoxifenol, 4,5-dicloro-2-metoxifenol, eugenol, tetracloroguaiacol, 4,5,6-tricloroguaiacol, hexaclorociclohexano, ácido hexadecanoico, 2-metoxifenol, 2,6-dimetoxifenol, por mencionar algunos (Kovacs, 1995; Gaete *et al.*, 2000).

Algunas especies del género *Trichoderma* pueden degradar pentacloronitrobenceno y pentaclorofenol, pero no degradan al hexaclorociclohexano (Cserjesi y Jhonson, 1972; Coque *et al.*, 2003; Montiel *et al.*, 2004). En el estudio realizado por van Leeuwen *et al.* (1997) se demuestra la capacidad que presenta *T. harzianum* para degradar 2,4,6-triclorofenol, 4,5-dicloroguaiacol, 3,4,5-tricloroguaiacol, tetracloroguaiacol y altas concentraciones de otros compuestos halogenados.

El ácido acrílico (La concentración letal que causó la muerte del 50% de la población (LC₅₀) de peces e invertebrados se encuentra en un rango de 27 a 236 mg L⁻¹; Staples *et al.*, 2000), el acrilato de metilo, el acrilato de etilo y el acrilato de butilo son empleados para elaborar cubiertas termoplásticas, adhesivos, selladores, pinturas de látex, principalmente (Hellwig *et al.*, 1997). La movilidad del ácido acrílico y de sus ésteres en el suelo es muy alto, además el ácido acrílico y el acrilato de metilo muestran baja biodegradabilidad de acuerdo a la prueba de demanda bioquímica de oxígeno; mientras que el acrilato de etilo y butilo fueron degradados fácilmente en el suelo.

Dave *et al.* (1996) indican que *Trichoderma* sp. degradó 2 g L⁻¹ de ácido acrílico (neutralizado con NaOH), empleando a este compuesto como única fuente de carbono. Sin embargo, la degradación aumentó al neutralizar al ácido acrílico con Ca(OH)₂ hasta en 10 g L⁻¹ durante, seis días.

Los compuestos sintéticos organofosforados son empleados como plaguicidas, plastificantes y como armas químicas, pero se utilizan principalmente en la elaboración de insecticidas. Varios reportes indican que una amplia gama de ecosistemas acuáticos y terrestres pueden estar contaminados con compuestos organofosforados, los cuales poseen alta toxicidad en mamíferos (Singh y Walker, 2006). *Trichoderma harzianum* es capaz de utilizar al clorpirifos (insecticida) como fuente de azufre y de fósforo (Omar, 1998); además, también es capaz de degradar glifosato y ácido aminometil fosfórico (Krzysko-Lupicka, 1997).

Los colorantes liberados por la industria textil y de alimentos son una amenaza latente para el ambiente, ya que son sustancias orgánicas complejas con varios anillos aromáticos de carácter recalcitrante. Estos compuestos son clasificados como colorantes aniónicos (ácidos), catiónicos (básicos) y no iónicos (Mishra y Tripathi, 1993). Para disminuir la contaminación que provocan los colorantes se han utilizado métodos físicos, químicos y biológicos. Los dos primeros métodos son caros y no específicos, por lo que los métodos biológicos han adquirido mayor importancia. Para este fin, se han empleado bacterias, hongos y algunas algas (Kaushik y Malik, 2009). Entre los hongos más empleados se encuentran *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizopus arrhizus*, *Ganoderma applanatum* y *Pleurotus ostreatus* por mencionar algunos (Kapdan *et al.*,

2000; Fu y Viraraghavan, 2001; Aksu, 2003; Pazarlioglu *et al.*, 2005; Aksu y Cagatay, 2006; Aksu *et al.*, 2007; Matos *et al.*, 2007; Zhao y Hardin, 2007).

El micelio de *T. harzianum* se ha probado como un material adsorbente para remover rodamina 6G en un sistema batch (Sadhasivam *et al.*, 2007), en el que se demuestra que la cantidad adsorbida de colorante (mg g^{-1}) aumenta al incrementar el tiempo de agitación y se alcanza el equilibrio a los 120 minutos en concentraciones de 10–50 mg L^{-1} . Por lo anterior se sugiere el empleo de la biomasa de *T. harzianum* para desarrollar sistemas que se puedan emplear en la remoción de colorantes.

El petróleo se puede dividir en cuatro clases: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Leahy y Colwell, 1990); *n*-eicosano es un hidrocarburo saturado que es degradado en un 73% por *Trichoderma* sp. S019 (Hadibarata y Tachibana, 2009). En contraste, *T. harzianum* tiene un potencial de degradación bajo ante la presencia de diesel en comparación con *Bacillus subtilis* (Nwaogu *et al.*, 2008).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, por sus siglas en inglés) son constituyentes del petróleo considerados como agentes cancerígenos y mutágenos (Chen y Liao, 2006; Liao y Chiang, 2006). No obstante, varios microorganismos como las bacterias y los hongos filamentosos son capaces de biodegradar este tipo de compuestos (Cerniglia *et al.*, 1985).

Chaîneau *et al.* (1999) reportaron la capacidad que tienen algunas especies de *Trichoderma* para degradar hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en el aceite combustible (**Cuadro 2.1**). Con base en estos resultados se observó que la estructura química de los hidrocarburos influyó en la capacidad de biodegradación por *Trichoderma*. Así, la degradación de hidrocarburos saturados por las cepas de

Trichoderma fue mayor en comparación con la observada para los hidrocarburos aromáticos.

No obstante, los mecanismos de degradación que presentan las especies del género *Trichoderma* para este tipo de sustancias químicas, aún no están totalmente dilucidados. En el caso de los hidrocarburos alifáticos y de PAH, la estructura química del contaminante y la temperatura, son factores que afectan directamente su degradación (Leahy y Colwell, 1990; Whyte *et al.*, 1999).

CUADRO 2.1. CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS SATURADOS Y AROMÁTICOS PRESENTES EN EL ACEITE COMBUSTIBLE QUE TIENEN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *Trichoderma*. (Chaîneau *et al.*, 1999).

Especie de <i>Trichoderma</i>	Porcentaje de degradación total (%)	Fracción de hidrocarburos degradados (%)	
		Saturados	Aromáticos
<i>Trichoderma polysporum</i>	27±9	54	28
<i>Trichoderma koningii</i>	24±5	34	21
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	27±4	33	24
<i>Trichoderma harzianum</i>	26±5	39	12

Las cepas fueron crecidas en 179 mg de aceite combustible, e incubadas a 27 °C durante 30 días.

En el trabajo de Hughes *et al.* (2007) las especies de *T. koningii* y *Trichoderma* sp. fueron expuestas a diferentes hidrocarburos saturados (dodecano, hexadecano) y aromáticos (ácido benzoico, ácido-*p*-hidroxibenzoico, tolueno, fenol, bifenil, naftaleno, *m* y *p*-xileno, y etilbenceno), a dos temperaturas (4 y 17 °C). Los compuestos volátiles se adicionaron en forma de vapor (0.5 g). Sin embargo, para los compuestos no volátiles se utilizó la concentración de 5 mM en el medio de cultivo. Los hidrocarburos aromáticos

inhibieron o detuvieron su crecimiento hifal, mientras que el crecimiento hifal no fue afectado por los hidrocarburos saturados con respecto al testigo.

Lo anterior refleja la alta toxicidad que presentan los compuestos aromáticos en el crecimiento de los hongos. El crecimiento del hongo en presencia de los hidrocarburos disminuyó en todos los casos a 4 °C, demostrando con ello que la temperatura afecta al desarrollo del hongo y su capacidad de degradación.

Por su parte, Ravelet *et al.* (2000) demostraron que *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* y *T. viride* tienen la capacidad de degradar pireno. Además de utilizar al pireno como fuente de carbono, *T. harzianum* contribuyó en la degradación de 65 y 33.7% de este monoaromático a partir de las concentraciones iniciales de 50 y 100 mg L⁻¹, respectivamente (Saraswathy y Hallberg, 2002).

Por otra parte, Matsubara *et al.* (2006) mencionan que el porcentaje de degradación de pireno y fenantreno (400 mg L⁻¹) por *T. harzianum*, fue menor del 10%, en comparación con los hongos *Pycnoporus coccineus* y *Coprinus cinereus* que tienen un porcentaje de degradación del 65 al 80%, en ambos contaminantes. Los tratamientos se incubaron a 30 °C y se analizaron a los 7, 14 y 28 días. Sin embargo, Hadibarata *et al.* (2007) encontraron que *Trichoderma* sp. S019 tiene una alta degradación de fenantreno (72%) empleando una concentración de 0.1 mM en medio líquido, durante un periodo de incubación de 30 días.

El porcentaje de degradación de benzo[a]pireno (BaP) que presenta *T. viride* es relativamente similar al de *Fusarium solani* (**Cuadro 2.2**), pero mayor al de *F. oxysporum*. Aún cuando *T. viride* degradó BaP, no se lograron detectar actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de este compuesto poliaromático, como son

la lacasa y la peroxidasa. Lo anterior sugiere que esta especie de *Trichoderma* tiene otro sistema enzimático para la degradación de BaP (Verdin *et al.*, 2004).

CUADRO 2.2. CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE BENZO[*a*]PIRENO POR ALGUNAS ESPECIES DE HONGOS (Verdin *et al.*, 2004).

Especie de hongo	Porcentaje de degradación (%)
<i>Trichoderma viride</i>	50
<i>Fusarium solani</i>	58
<i>Fusarium oxysporum</i>	30

La concentración inicial de benzo[*a*]pireno fue de 0.4 mM, los cultivos fueron incubados a 25 °C durante 30 días.

En el caso de compuestos explosivos, el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) es conocido por su alta toxicidad y mutagenicidad en animales, peces, plantas y microorganismos; es relativamente tóxico para los humanos por inhalación, absorción oral y contacto con la piel, provoca cianosis y anemia (Simini *et al.*, 1995; Robidoux *et al.*, 1999). El proceso de fabricación de este explosivo ha contribuido en la contaminación del suelo y sistemas acuáticos (Valsaraj *et al.*, 1998).

Para la remediación de suelos contaminados con explosivos, la incineración es una de las tecnologías ambientales frecuentemente empleada por su alta efectividad, misma que ha llegado a ser del 99.9%. Sin embargo, puede destruir la estructura del suelo y liberar compuestos tóxicos a la atmósfera (Hundal *et al.*, 1997; Krumholz *et al.*, 1997).

Los métodos biológicos para remediar suelos contaminados son más amigables con el ambiente, por lo cual se ha tratado de encontrar tecnologías biológicas que puedan aplicarse con dichos fines (Palmer *et al.*, 1997). En suelos contaminados con TNT se ha

logrado aislar bacterias y hongos capaces de degradar este compuesto, de los cuales se han identificado algunos géneros fúngicos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Trichoderma*, mismos que muestran variaciones en la tolerancia hacia TNT (Bennett *et al.*, 1995). En el caso particular de *T. viride*, este hongo es capaz de transformar al TNT en un 16%, a metabolitos solubles como 2,2',6,6'-tetranitro-4,4'-azoxitolueno, 4-amino-2,6-dinitrotolueno y 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno. Además, este hongo presenta mayor tolerancia al TNT, en comparación con *Schizophyllum commune* y *Cladosporium resinae* (Bayman y Radka, 1997).

En condiciones anaerobias los grupos nitrogenados del TNT se reducen uno a uno, en grupos amino; sin embargo, cada reducción es más lenta y menos completa que la anterior. Si las condiciones pasan a una condición aerobia, los intermediarios parcialmente reducidos forman productos de condensación de tipo azo, que son moléculas más estables y por lo tanto más recalcitrantes, además de ser agentes mutagénicos.

La anterior ruta de degradación del TNT (**Fig. 2.4**) ha sido caracterizada mediante la inoculación del hongo de la pudrición blanca de la madera *Phanerochaete chrysosporium* (Fernando *et al.*, 1990; Spain, 1995). Algunos de los metabolitos formados durante la degradación de TNT por *P. chrysosporium* también fueron formados por *Trichoderma viride*.

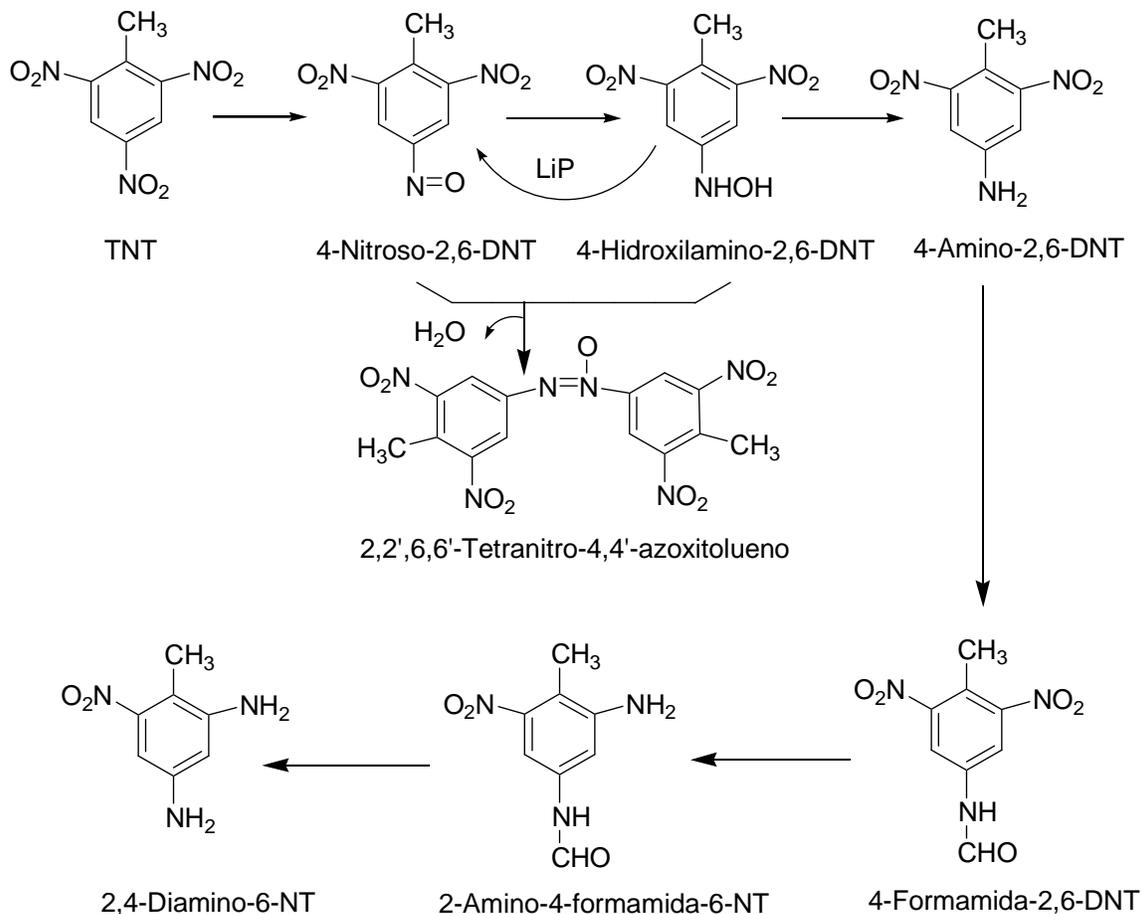


Figura 2.4. Metabolitos intermediarios formados durante la degradación aerobia de TNT por *Phanerochaete chrysosporium*. La 2,2',6,6'-tetranitro-4,4'-azoxitolueno y la 4-amino-2,6-dinitrotolueno se formaron durante la degradación de TNT por *Trichoderma viride* (Spain, 1995; Bayman y Radka, 1997).

2.4. INTERACCIÓN DE TRICHODERMA CON COMPUESTOS INORGÁNICOS

Las sustancias inorgánicas se consideran sustancias inanimadas o inertes. Algunos ejemplos de estas sustancias son los metales, los minerales primarios y los secundarios, los ácidos minerales, las bases, las sales, los óxidos de metales y no metales. La interacción que existe entre los metales y los microorganismos es diferente a aquella que se presenta en presencia de compuestos orgánicos. En particular, los metales no pueden transformarse en otras sustancias, ni tampoco están sujetos a procesos de mineralización.

En este caso, el microorganismo inmoviliza a los metales a través de mecanismos fisiológicos y bioquímicos que favorecen la quelatación, la acumulación y la biosorción, así como el cambio de estado de oxidación del metal (Vullo, 2003). También son capaces de movilizarlos por medio de la biolixiviación que es una forma de solubilizar metales (Brombacher *et al.*, 1998).

2.4.1. Elementos potencialmente tóxicos

Alloway (1995) propuso el término de elementos potencialmente tóxicos (EPT) para incluir a elementos esenciales o no esenciales y metaloides. Los EPT son contaminantes de origen inorgánico generalmente de carácter metálico, que afectan al ambiente ya que dependiendo de su estado de oxidación, pueden ser móviles en el suelo y ser lixiviados a través del perfil edáfico hacia los mantos freáticos y con ello producirse la contaminación del agua (Palacios *et al.*, 1989). Varios microorganismos del suelo son capaces de acumular en su biomasa altas concentraciones de EPT mediante sus actividades fisiológicas y pueden además secretar metabolitos secundarios que tienen la capacidad de quelatar EPT, tanto de manera extracelular como intracelular (Babich y Stotzky, 1985; Díaz-Raviña y Baath, 1996).

En suelos contaminados con EPT se han encontrado aislados fúngicos que pertenecen al género *Trichoderma*, denotando su capacidad para tolerar estos contaminantes inorgánicos, cuyo potencial tóxico es elevado. En el cuadro 2.3 se muestran las concentraciones máximas inhibitorias de diferentes metales para *Trichoderma* sp. en condiciones *in vitro*, de acuerdo con Shaheen *et al.* (2007). Se ha reportado que *T. viride* tiene la capacidad de remover altas concentraciones de cromo

hexavalente [Cr(VI)] de soluciones acuosas (Morales-Barrera y Cristiani-Urbina, 2006). Por su parte, Vankar y Bajpai (2008) probaron a *Trichoderma* sp. en diferentes concentraciones de cromo hexavalente (4, 6, 8 y 10 mg L⁻¹), la cual mostró una biosorción del 76.1, 94.2, 96.0 y 97.4% respectivamente, en un rango de pH de 5.5 a 5.8. Además mencionan que para valores fuera de tal rango de pH, la capacidad de biosorción disminuye significativamente. La biosorción vía microorganismos es más económica tanto en términos de costo de instalación como de operación y mantenimiento, pues los métodos químicos resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización (Cañizares-Villanueva, 2000).

No obstante, la presencia de EPT puede afectar la nutrición del hongo que se refleja en el limitado crecimiento del micelio. Lo anterior se ejemplifica con la disminución del micelio, longitud y ramificaciones de *T. viride* observada en presencia de Cu y de Cd. (Gadd *et al.*, 2001). Algunos estudios reportan la habilidad de *T. viride* para tolerar y bioacumular Cu. Por ejemplo, Anand *et al.* (2006) señalan una remoción de 3.4 mg L⁻¹ en 72 h, a partir de una concentración inicial de 100 mg de CuCl₂ L⁻¹, señalando también que la temperatura y el pH afectan la biosorción de Cu por el hongo.

Trichoderma atroviride aislada de lodos procedentes de aguas residuales, presenta tolerancia a altos contenidos de Zn, Cd y Cu. Sin embargo, el crecimiento del hongo disminuye en presencia de la combinación binaria de cualquiera de estos metales, debido al aumento de su toxicidad (López-Errasquín y Vázquez, 2003). Por otra parte, *T. asperellum* presenta la capacidad de tolerar altas concentraciones de aluminio (100-200 mM) bajo un rango de pH de 2.2-2.5.

CUADRO 2.3. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE ALGUNOS METALES PARA EL CRECIMIENTO DE *Trichoderma* sp. (Shaheen *et al.*, 2007).

Metal	Concentración inhibitoria (mg L ⁻¹)
Cobalto	4
Cromo	6
Cobre	4
Cadmio	3
Níquel	3

Además, este hongo indujo un incremento en el pH alrededor de 6.2-7.0, como estrategia fisiológica para favorecer la precipitación del aluminio y evitar de esa forma sus efectos tóxicos (Kawai *et al.*, 2000). En el caso de la tolerancia de un microorganismo hacia los EPT, existen varios factores que influyen en ella, tal es el caso del pH, el cual produce una amplia gama de respuestas de tolerancia y susceptibilidad en el microorganismo. De este modo, la acumulación de Zn por *T. harzianum* se incrementó hasta diez veces cuando el pH fue de 3 y 5. Por otra parte, la biosorción de Cu, Cd y Zn por *T. viride* (en promedio de 78 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco) fue 5.5 veces más baja en comparación con la observada en las arcillas montmorillonita y caolinita (435 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Pero cuando se expresa por unidad de superficie enlazada con el metal, el hongo (36.6 $\mu\text{mol m}^{-2}$) presenta mayor capacidad de adsorción que las arcillas (3.1 $\mu\text{mol m}^{-2}$) (Morley y Gadd, 1995). Lo anterior demuestra que *Trichoderma* es capaz de retener metales en abundantes cantidades en su micelio, así como en sus esporas (Lokesh y Somashekar, 1989).

El arseniato de cromo y cobre (CCA) es utilizado como protector de madera aplicado en exteriores cuyos residuos contribuyen en la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos (Kartal y Muehl, 2001; Helsen y van Den Bulck, 2005). Para evitar

este problema ambiental se han empleado procesos químicos que involucran el uso de algunos ácidos minerales y orgánicos para poder separar a los tres componentes que forma esta sal, de tal manera que puedan ser reciclados (Kartal *et al.*, 2004). Aunque también se han empleado bacterias y hongos para dicho propósito como una alternativa biológica, ya que estos microorganismos son capaces de secretar varios ácidos orgánicos, entre los más importantes se encuentran el ácido oxálico y ácido cítrico (Kartal *et al.*, 1991; Clausen y Smith 1998). Kartal *et al.* (2006) probaron la capacidad que tienen algunos hongos filamentosos para producir ácido oxálico y remover CCA (en una concentración de 0.6%) a partir de madera impregnada con dicho compuesto, encontrando que *T. viride* TRV 4847 es uno de los tres mejores hongos productores de ácido oxálico. Además, la remoción de cobre en el proceso de remediación fue más del 90% para *Trichoderma*, y para cromo y arsénico fue del 20% y 40%, respectivamente. Lo cual indica que *Trichoderma* puede ser empleado para dar tratamiento a las maderas tratadas con CCA.

2.4.2. Cianuro

El cianuro es liberado al ambiente en desechos sólidos y aguas residuales de las diferentes actividades industriales como el galvanizado de metales, electrolisis de aluminio, gasificación de carbón, lixiviación de minerales y en la síntesis de fármacos, fibras y plásticos (Nazly y Knowles, 1981). A su vez, el cianuro es un inhibidor metabólico que daña a las células (Knowles y Bunch, 1986). Los residuos que van acompañados con cianuro se han tratado utilizando técnicas químicas como precipitación, neutralización, hidrólisis y oxidación-reducción por mencionar algunas, que son

agresivas con el ambiente. Por lo anterior se buscan otras alternativas biológicas para la remediación de los sistemas contaminados con este compuesto (Richards y Shieh, 1989). El hongo *Trichoderma* spp. se ha empleado para la destoxificación de cianuro ya que posee dos enzimas, rodanasa y cianuro hidratasa, capaces de degradarlo (Ezzi y Lynch, 2002). Además, la adición de glucosa como fuente de carbono alternativa al medio contaminado incrementa la velocidad de degradación del cianuro por la cepa de *Trichoderma* spp. (Ezzi y Lynch, 2005a,b). Varias especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de metabolizar cianuro vía rodanasa y cianuro hidratasa (**Fig. 2.5**), pero no se ha encontrado evidencia de que utilicen la ruta de la β -cianoalanina sintetasa (Ezzi y Lynch, 2003), lo que indica que no es común encontrar esta enzima en los hongos, en comparación con plantas y algunas bacterias (Raybuck, 1992). Sin embargo, Ezzi y Lynch (2005a) han demostrado que la degradación de cianuro utilizando a *Trichoderma* spp. asociada a plantas es posible; al encontrar que la germinación de semillas de chícharo y trigo no mostrarán ninguna inhibición al ser cubiertas con esporas de *Trichoderma* en un suelo contaminado con cianuro de potasio (50 y 100 mg Kg⁻¹).



Figura 2.5. Mecanismo enzimático que presenta *Trichoderma* spp. durante la degradación de cianuro (Ezzi y Lynch, 2005a).

2.5. APORTACIONES GENERADAS

Todos los antecedentes mencionados dan un panorama general del potencial biotecnológico que tiene el género *Trichoderma* y sus diversas aplicaciones en procesos industriales. Sin embargo, si hablamos específicamente de su posible potencial en la biorremediación de hidrocarburos del petróleo y en especial de compuestos poliaromáticos, los estudios realizados son casi nulos. Lo que se ha reportado es la degradación de fenantreno, pireno y benzo[*a*]pireno por algunas especies del género *Trichoderma*. Cabe mencionar que estas investigaciones se enfocan en evaluar la capacidad de degradación y actividad enzimática de diferentes hongos como *Fusarium*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* por mencionar algunos, en los que se encuentran especies del género *Trichoderma*. Las degradaciones de estos contaminantes, varían de acuerdo a la especie de *Trichoderma* probada, concentración del compuesto poliaromático y condiciones de estudio, principalmente. Por otro lado, los estudios que evalúan aspectos de tolerancia de compuestos poliaromáticos, específicamente por especies del género *Trichoderma* son escasos. Una parte de la presente investigación contribuye en ese sentido, generar información sobre la tolerancia de once cepas del género *Trichoderma* a petróleo crudo, naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno. También contribuye dando información sobre la eficiencia de degradación de dos cepas de *Trichoderma*, previamente seleccionadas de las pruebas de tolerancia, además muestra el efecto que tiene el naftaleno y fenantreno sobre el metabolismo secundario de estas dos cepas seleccionadas. Finalmente, también muestra la expresión del citocromo P-450 en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno en una de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas, lo cual no se había hecho en otros estudios. Toda esta información

generada, tiene como objetivo servir de base, para la generación de biotecnologías de biorremediación de compuestos poliaromáticos empleando hongos del género *Trichoderma*.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ONCE CEPAS DEL GÉNERO *TRICHODERMA*

RESUMEN

El género *Trichoderma* fue propuesto por Persoon con cuatro especies. Posteriormente, Rifai agrega nueve especies más. Sin embargo, los estudios morfológicos más completos fueron realizados por Bissett, quien incluyó a las especies descritas por Rifai en cuatro secciones: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Hypocreanum*. Sin embargo, el uso de técnicas moleculares ha retado la frontera morfológica que define a las especies del género *Trichoderma*, dejando un pequeño número de especies reales que integran a este género fúngico. En los últimos años, 88 taxones han sido recientemente redefinidos mediante el uso de herramientas moleculares. Dentro de los 88 taxones, se tienen 14 que presentan el estado holomorfo, 49 descritas en *Hypocrea*, y 25 descritas en *Trichoderma*. El presente trabajo tuvo como finalidad identificar a nivel de especie, once aislamientos de *Trichoderma* procedentes de algunos estados de la República Mexicana (Veracruz, Jalisco, Guanajuato, Oaxaca y Estado de México), empleando herramientas morfológicas y moleculares. De los once aislamientos fúngicos, cuatro pertenecieron al género que presenta el estado holomorfo *Hypocrea virens/Trichoderma virens*, tres a *T. viride*, dos al género holomorfo *Hypocrea koningii/Trichoderma koningii*, uno a *T. harzianum*, y uno a *T. atroviride*. Se encontró alta correlación entre el análisis morfológico y el análisis genético entre las once cepas de estudio, lo cual permite concluir que ambos análisis (morfológico y molecular) son complementarios.

Palabras clave: *Trichoderma*, caracterización, morfología, análisis molecular

CHAPTER III
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION
OF ELEVEN STRAINS OF THE *Trichoderma* GENUS

ABSTRACT

The fungal genus *Trichoderma* was proposed by Persoon in which included four species. Afterwards, Rifai added nine more species. Nevertheless, the most complete morphological studies were performed by Bisset who included the species described by Rifai into four sections: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, and *Hypocreanum*. However, the utilization of molecular tools has challenged the morphological frontier that defines the *Trichoderma* species, thus, leaving a small group of real species integrating this fungal genus. During the latest years, 88 new taxa have been redefined via molecular techniques. Among those 88 taxa, 14 had the holomorph state, 49 were described as *Hypocrea*, and 25 described as *Trichoderma*. This research identified at species level, eleven *Trichoderma* strains isolated from some states of Mexico (Veracruz, Jalisco, Guanajuato, Oaxaca, and Estado de Mexico), by using both morphological and molecular tools. From the eleven isolates, four of them belonged to the holomorph genus *Hypocrea virens/Trichoderma virens*, three belonged to *T. viride*, two of them belonged to the holomorph genus *Hypocrea koningii/Trichoderma koningii*, one to *T. harzianum*, and one to *T. atroviride*. A high correlation was found between the morphological analysis and the genetic analysis of the eleven fungal strains, which allow concluding that both analyses (morphological and molecular) complement each other.

Key words: *Trichoderma*, characterization, morphology, molecular analysis

3.1. INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* fue propuesto por Persoon (1794) con cuatro especies. Rifai (1969) agrega nueve especies más, y menciona que no hay una forma real para definir a las especies biológicas en términos morfológicos ya que estos caracteres están continuamente cambiando y no hay manera de saber el grado de variación tolerable dentro de una especie individual. La sección *Saturnisporum* para el género *Trichoderma* fue introducida por Doi *et al.* (1987) basada en la ornamentación de los conidios de las especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense*. Los estudios morfológicos de los anamorfos (forma asexual del hongo) más completos fueron realizados por Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c y 1992), que eleva algunas de las especies añadidas por Rifai (1969) a rango de sección, agrupándolos en cuatro secciones: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Hypocreanum*, además considera conveniente adicionar la sección *Saturnisporum* descrita en la sección *Longibrachiatum*. También, Bissett (1991a, 1991b, 1991c) distingue cerca de 21 taxa en la sección *Pachybasium* y 7 en la sección *Longibrachiatum*. Samuels (1996) menciona que el número de especies que realmente existe, dependerá de la definición de especie, tomando en cuenta que la mayoría de las especies del género *Hypocrea* representan especies de *Trichoderma*. Sin embargo, al usar técnicas moleculares, la frontera morfológica que define a las especies del género *Trichoderma* desaparecerá a muchas de estas especies, y quedará un pequeño número de especies reales que integren a este género (Bissett *et al.*, 2003).

Los miembros de las secciones *Pachybasium* y *Trichoderma* son cosmopolitas y presentan alta variabilidad interespecífica e intraespecífica. Por su importancia económica se han caracterizado molecularmente, indicando que éstas dos secciones

contienen especies filogenéticamente relacionadas una con otra (Gomez *et al.*, 1997; Kuhls *et al.*, 1997; Kindermann *et al.*, 1998). Tal es el caso de *T. harzianum* y *T. hamatum* que pertenecen a la sección *Pachybasium* de acuerdo a sus caracteres morfológicos, mientras que molecularmente pertenecen a la sección *Trichoderma* (Bisset, 1991c; Kindermann *et al.*, 1998; Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002).

La sección *Longibrachiatum* es la sección más pequeña de *Trichoderma* y filogenéticamente la más distante entre las otras secciones, además es reconocida por ser monofilética y contiene 10 taxa, dentro de los cuales se encuentran cuatro miembros con una relación anamorfo-telemorfo (forma sexual del hongo): *H. schweinitzii*/*T. citrinoviride*; *H. pseudokoningii*/*T. pseudokoningii*; *H. jecorina*/*T. reesei* y *H. orientalis*/*T. longibrachiatum* (Samuels *et al.*, 1998). Lo anterior denota que la relación entre sus caracteres morfológicos y su filogenia molecular es una de las más complejas en el género *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2005).

Poco se sabe de la reproducción sexual de las especies de *Trichoderma* y los telemorfos conocidos son especies del género *Hypocrea* Fr. y géneros relacionados con miembros de los Ascomycetes, orden Hipocreales (Kuhls *et al.*, 1997; Dodd *et al.*, 2003). Los análisis filogenéticos muestran que *Trichoderma* e *Hypocrea* son congénicas y se podría pensar que *Trichoderma* es *Hypocrea* (Samuels, 2006). Esta investigación pretende identificar morfológicamente y molecularmente once cepas de *Trichoderma*, con la finalidad de conocer la especie a la cual pertenecen.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Identificación morfológica de las once cepas fúngicas

Las cepas fúngicas fueron aisladas de diferentes estados de la República Mexicana: las cepas CP1, CP4, CP23, CP38 y CP56 se aislaron de suelo tomado de la rizosfera de la vegetación de mezquite (*Prosopis* sp.) en el estado de Jalisco; las cepas CP3 y CP37 se aislaron de muestras de suelo recogidas de árboles forestales de hoja caduca en el estado de Veracruz; la cepa CP22 se aislaron de tierra tomada de la rizosfera de árboles de litchi en el estado de Oaxaca; la cepa CP46 se aisló de suelo recogido en zonas de cultivo de lechuga y ajo en el estado de Guanajuato; la cepa CPTGC se aisló de suelo recogido de zonas hortícolas de Xochimilco y Chapingo en el Estado de México, y la cepa CPX se obtuvo como una contaminación en cajas de Petri utilizadas en el laboratorio de microbiología de suelos del Colegio de Postgraduados en el Estado de México. Cabe mencionar que las cepas CP3, CP4, CP23, CP38, CP46 y CP56 tienen la capacidad de parasitar y degradar esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* (Ibarra-Medina *et al.*, 2010).

3.2.1.1. Descripción macroscópica

La caracterización macroscópica se realizó tomando en cuenta el aspecto de la colonia fúngica, considerando el color, tipo de micelio, cambio de color en el medio de cultivo y aroma.

3.2.1.2. Descripción microscópica

Para la identificación microscópica se hicieron preparaciones microscópicas utilizando microcultivos con la técnica de Riddell (1950). Estas preparaciones fueron observadas cada 24 h por un período de 4 días, cada una de las preparaciones se revisaron

y se describieron de acuerdo a las claves taxonómicas de Bissett (1991a, 1991b, 1991c) existentes para la identificación de especies del género *Trichoderma*, considerando el tipo, forma y tamaño de los conidióforos, fialides y esporas principalmente.

3.2.2. Caracterización molecular de las once cepas fúngicas

La caracterización molecular se realizó utilizando los iniciadores diseñados por Hagn *et al.* (2007) para identificar especies del género *Trichoderma*, el iniciador forward **uTf** (5'-AACGTTACCAAACACTGTTG-3') y el iniciador reverse **uTr** (5'-AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3'). El iniciador forward comprende las últimas nueve pares de bases del 18S rRNA y las primeras nueve pares de bases de la región ITS1, mientras que el iniciador reverse comprende de la posición 48 a la 57 del ADNr 28S de la secuencia de *T. harzianum* (AY605713), que amplifica un segmento de 540 pares de bases.

3.2.2.1. Extracción de ADN y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los iniciadores de *Trichoderma* de las once cepas fúngicas

La extracción de ADN de las once cepas de *Trichoderma* se hizo de acuerdo al protocolo descrito por González-Mendoza *et al.* (2010). Una vez obtenido las muestras de ADN estas fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso. La concentración y calidad de las muestras se determinaron a 230, 260 y 280 nm (A260/280 y A260/230 índices) las cuales se realizaron usando 2 µL de ADN resuspendido en agua tratada con DEPC. La visualización del ADN (10 microlitros) se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La reacción de PCR se preparó con 5 µg del DNA total de acuerdo al protocolo del kit de un volumen de 30 µL, la mezcla de

reacción consistió de 18.1 μL de agua con DEPC (Dietilpirocarbonato) estéril, 3 μL de amortiguador 10X, 2.5 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL dNTP 10 mM, 1.6 μL de cada iniciador, 0.2 μL de ADN polimerasa de 500 unidades (Platinum®, Invitrogen) y 2 μL de ADN a una concentración de 20 ng μL^{-1} . Se utilizó el programa de amplificación propuesto por Hagn *et al.* (2007) para los iniciadores **uTf** y **uTr**. Se inició con una predesnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 55.5 °C y 30 seg a 72 °C; con una extensión a 72°C por 7 min. La amplificación se realizó en un termociclador automático (Labnet International®, Mod. Multigene). Los productos de PCR amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1.0 % y se visualizaron en un transiluminador Benchtop Variable Transilluminator® y se analizaron con el programa Quantity One 4.0.3.

3.2.2.2. Purificación y secuenciación de las cepas de *Trichoderma*

El ADN de las cepas fúngicas, obtenido de los productos de PCR con los iniciadores **uTf** (5'-AACGTTACCAAACCTGTTG-3') y **uTr** (5'-AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3'), se purificaron con la técnica de purificación fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). Los productos purificados (40 ng) se enviaron a secuenciar a CINVESTAV-Irapuato. Las secuencias obtenidas se analizaron en la base de datos GenBank con el paquete BLAST (<http://WWW.INCB.BLAST>).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Identificación macroscópica y microscópica

De las once cepas de *Trichoderma* que fueron estudiadas en esta investigación; cuatro de ellas fueron afines con *T. virens*, tres a *T. viride*, dos a *T. koningii*, una a *T.*

atroviride, y una a *T. harzianum*, considerando sus características morfológicas (Cuadro 3.1).

CUADRO 3.1. AFINIDAD TAXONÓMICA DE LAS ONCE CEPAS EVALUADAS DE ACUERDO A SUS CARACTERES MORFOLÓGICOS.

Cepa	Sección†	Afinidad con la especie	Lugar de aislamiento
CP1	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Jalisco
CP22	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Oaxaca
CP37	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Veracruz
CP46	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Guanajuato
CP4	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Jalisco
CP23	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	Jalisco
CP38	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Jalisco
CP56	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Jalisco
CP3	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	Veracruz
CPTGC	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Estado de México
CPX	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	Estado de México

† Sección taxonómica del género *Trichoderma* (Bissett *et al.*, 1991).

La cepa CP1 presentó afinidad con *T. virens* sección *Pachybasium* (Bissett *et al.*, 1991), aislamiento que se obtuvo de suelo tomado de la rizosfera de la vegetación de mezquite (*Prosopis* sp.) del estado de Jalisco. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde azulado oscuro, el reverso de la placa es café. El micelio aéreo es flucoso difuso. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.79-4.92 µm. Los conidióforos surgen como ramas laterales del micelio aéreo, con una o dos ramificaciones fértiles, hacia el ápice la ramificación es irregular; cada rama terminal contiene grupos de 3 a 6 fiálides aprensadas muy cerca una de otras (Fig. 3.1). Las fiálides son ampuliformes y langeniformes de 4.13 a 10.60 µm de longitud y de 1.45 a 3.04 µm en su parte más ancha. Los conidios son verdes, elipsoidales u ovoides de 3.39 a 5.31 µm de longitud x 2.11 a 4.01 µm de ancho.

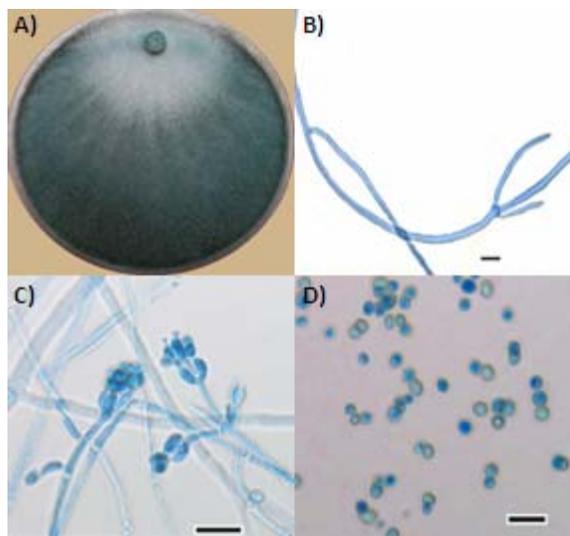


Figura 3.1. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP1 afín a *Trichoderma virens*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP22 presentó afinidad con *T. virens* sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991), aislamiento que se obtuvo de suelo rizosférico de árboles de litchi del estado de Oaxaca. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde oliva oscuro, el reverso de la placa es café. El micelio aéreo es flucoso difuso (**Fig. 3.2**). A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.28-4.17 μm . Los conidióforos surgen como ramas laterales del micelio aéreo, con una o dos ramificaciones fértiles, hacia el ápice la ramificación es irregular; cada rama terminal contiene grupos de 3 a 6 fiálides aprensadas muy cerca una de otras. Las fiálides son ampuliformes y langeniformes de 5.14 a 12.56 μm de longitud y de 1.47 a 3.75 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes, elipsoidales u ovoides de 2.66 a 5.47 μm de longitud x 1.64 a 3.59 μm de ancho.

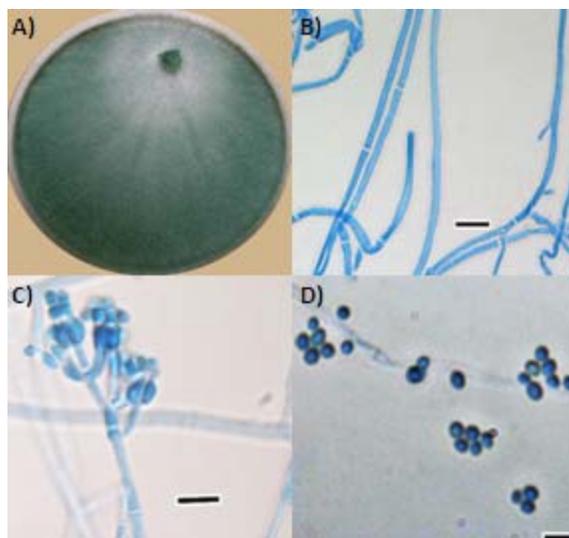


Figura 3.2. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP22 afín a *Trichoderma virens*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP37 presentó afinidad con *T. virens* sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991), aislamiento obtenido de muestras de suelo recogidas de árboles forestales de hoja caduca del estado de Veracruz. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde oliva oscuro, el reverso de la placa es café (**Fig. 3.3**). El micelio aéreo es flucoso difuso. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.45-5.11 μm . Los conidióforos surgen como ramas laterales del micelio aéreo, con una o dos ramificaciones fértiles, hacia el ápice la ramificación es irregular; cada rama terminal contiene grupos de 3 a 6 fiálides aprensadas muy cerca una de otras. Las fiálides son ampuliformes y langeniformes de 4.73 a 12.6 μm de longitud y de 1.58 a 4.01 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes, elipsoidales u ovoides de 3.27 a 5.95 μm de longitud x 3.11 a 4.89 μm de ancho.

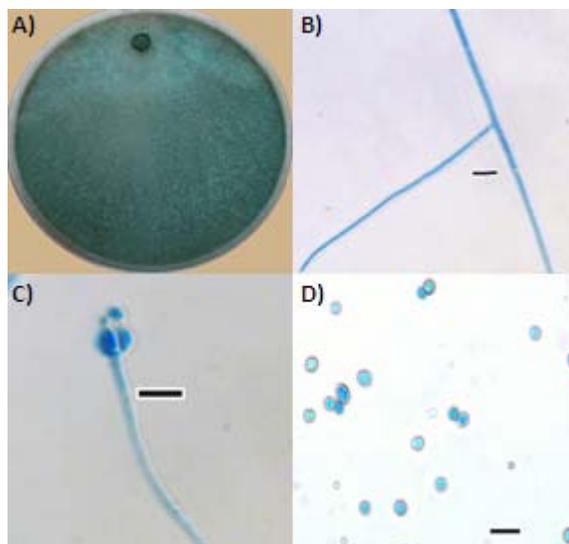


Figura 3.3. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP37 afin a *Trichoderma virens*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP46 presentó afinidad con *T. virens* sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991), aislamiento obtenido de suelo recolectado en zonas de cultivo de lechuga y ajo del estado de Guanajuato. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde oliva grisáceo, el reverso de la placa es café. El micelio aéreo es flucoso difuso. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro (**Fig. 3.4**). Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.79-5.29 μm . Los conidióforos surgen como ramas laterales del micelio aéreo, con una o dos ramificaciones fértiles, hacia el ápice la ramificación es irregular; cada rama terminal contiene grupos de 3 a 6 fiálides aprensadas muy cerca una de otras. Las fiálides son ampuliformes y langeniformes de 4.7 a 11.89 μm de longitud y de 1.54 a 3.86 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes, elipsoidales e ovoides de 4.03 a 6.12 μm de longitud x 2.68 a 4.79 μm de ancho.

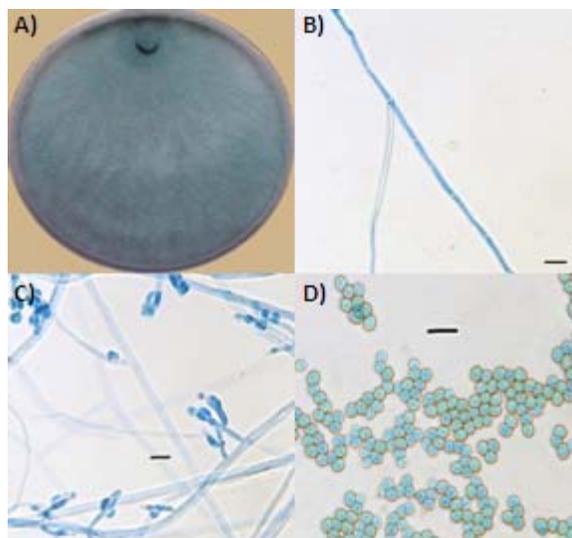


Figura 3.4. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP46 afín a *Trichoderma virens*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP4 presentó afinidad con *T. viride* sección *Trichoderma* (Meyer y Plaskowitz, 1989), aislamiento obtenido de suelo rizosférico de mezquite (*Prosopis* sp.) del estado de Jalisco. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde oliva oscuro, el reverso de la placa es incoloro, presenta aroma a coco. El micelio aéreo es flocoso aracnoide. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 2.07-4.46 μm . Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares y cortas, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fiálides largas con verticilos terminales de hasta 4 fiálides con una longitud de 4.77 a 12.62 y 1.53 a 3.32 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes globosos y elipsoidales de 1.72 a 5.06 μm de longitud y 2.05 a 4.45 μm de ancho (**Fig. 3.5**).

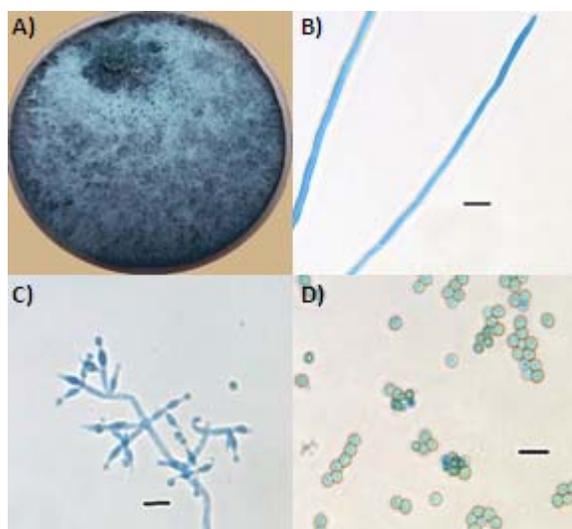


Figura 3.5. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP4 afín a *Trichoderma viride*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y globosas observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP23 presentó afinidad con *T. koningii* sección *Trichoderma* (Rifai, 1969), aislamiento que se obtuvo de suelo recolectado de la rizosfera de mezquite (*Prosopis* sp.) del estado de Jalisco. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde pálido oscuro, el reverso de la placa es incoloro. El micelio aéreo es flocoso. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.71-5.45 μm . Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales (**Fig. 3.6**). El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fíalides ampuliformes y langeniformes con verticilos terminales de hasta 4 fíalides con una longitud de 4.53 a 12.77 y 1.28 a 3.33 μm en su parte más ancha, la fíalide terminal es más alargada. Los conidios son verdes elipsoidales estrechos de 2.99 a 4.79 μm de longitud y 1.65 a 3.27 μm de ancho.

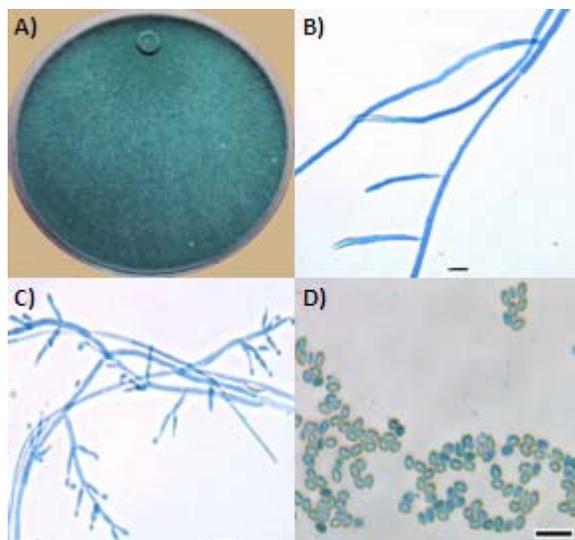


Figura 3.6. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP23 afín a *Trichoderma koningii*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales estrechas observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP38 presentó afinidad con *T. harzianum* sección *Trichoderma* (Rifai, 1969; Gams y Meyer, 1998), aislamiento obtenido de suelo recolectado de la rizosfera de mezquite (*Prosopis* sp.) del estado de Jalisco. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando de verde a verde oscuro rápidamente, el reverso de la placa es amarillento pálido, presenta un ligero aroma a tierra. El micelio aéreo es de apariencia granular. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro (**Fig. 3.7**). Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.74-6.53 μm . Los conidióforos consisten en estructuras muy ramificadas, de las ramas principales nacen ramas laterales que a su vez se vuelven a ramificar, todo ello en ángulo recto y dando lugar a una figura piramidal. Fiálides ampuliformes y langeniformes, se presentan de 3 a 4 verticilos con verticilos terminales de hasta 3 fiálides con una longitud de 5.34 a 11.69 y 1.71 a 3.25 μm en su parte más ancha. Los

conidios son verdes subglobosos y ovoides de 3.36 a 5.32 μm de longitud y 2.83 a 4.74 μm de ancho.

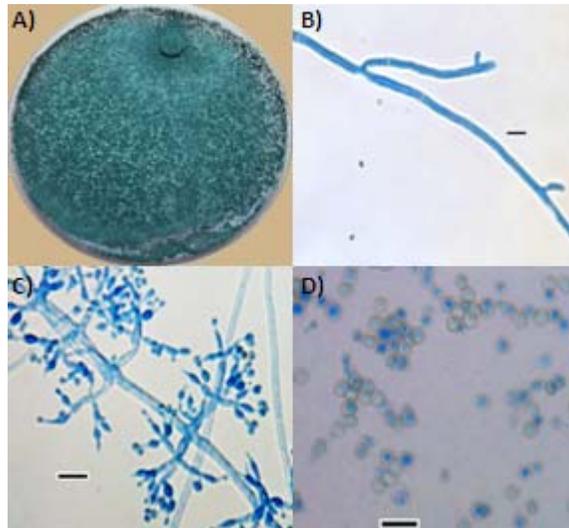


Figura 3.7. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP38 afin a *Trichoderma harzianum*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas subglobosas y ovoides observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP56 presentó afinidad con *T. viride* sección *Trichoderma* (Meyer y Plaskowitz, 1989), aislamiento que se obtuvo de suelo recolectado de la rizosfera de mezquite (*Prosopis* sp.) del estado de Jalisco. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde verde claro hasta verde oliva oscuro, el reverso de la placa es incoloro, presenta aroma a coco. El micelio aéreo es flocoso aracnoide. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.81-4.64 μm . Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares y cortas, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fiálides largas con verticilos terminales de hasta 4 fiálides

con una longitud de 5.98 a 13.32 y 1.21 a 4.34 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes globosos y elipsoidales de 2.55 a 4.49 μm de longitud y 1.7 a 3.6 μm de ancho (Fig. 3.8).

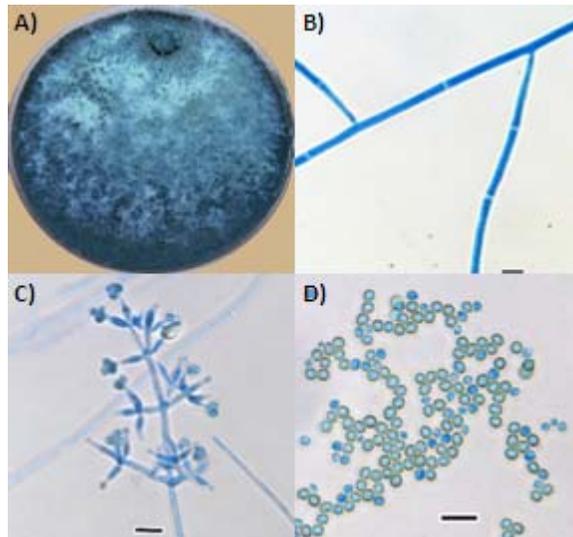


Figura 3.8. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP56 afín a *Trichoderma viride*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y globosas observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CP3 presentó afinidad con *T. koningii* sección *Trichoderma* (Rifai, 1969), aislamiento obtenido de muestras de suelo rizosférico de árboles forestales de hoja caduca del estado de Veracruz. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando rápidamente a verde claro, el reverso de la placa es incoloro. El micelio aéreo es flocooso aracnoide. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.28-5.28 μm . Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Presenta fiálides langeniformes y más o

menos ampuliformes, en pares con verticilos terminales de hasta 3 fiálides con una longitud de 4.16 a 15.33 y 1.20 a 2.42 μm en su parte más ancha, la fiálide terminal es más alargada (**Fig. 3.9**). Los conidios son verdes elipsoidales estrechos de 3.30 a 5.08 μm de longitud y 2.25 a 3.45 μm de ancho.

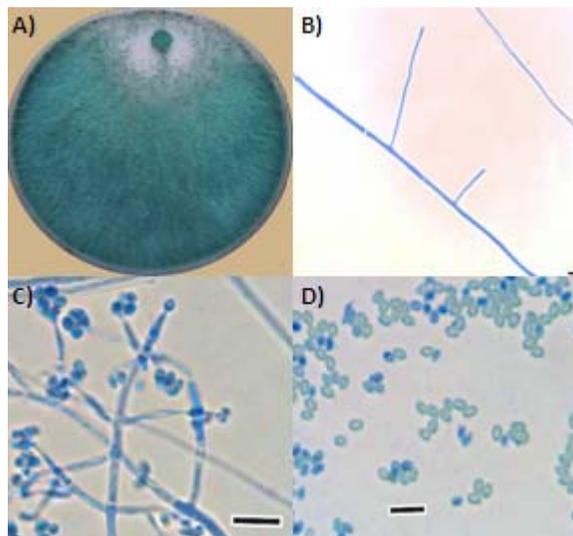


Figura 3.9. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CP3 afin a *Trichoderma koningii*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales estrechas observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CPTGC presentó afinidad con *T. viride* sección *Trichoderma* (Meyer and Plaskowitz, 1989), aislamiento obtenido de suelo recolectado de zonas hortícolas de Xochimilco y Chapingo en el Estado de México. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando rápidamente a verde oscuro, el reverso de la placa es incoloro (**Fig. 3.10**). El micelio aéreo es flucoso aracnoide. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.64-4.75 μm . Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares y cortas, en algunos casos se observa la

formación de ramas laterales. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fiálides largas con verticilos terminales de hasta 4 fiálides con una longitud de 5.37 a 16.21 y 1.03 a 2.76 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes elipsoidales y globosos de 3.06 a 4.39 μm de longitud y 2.30 a 3.36 μm de ancho.

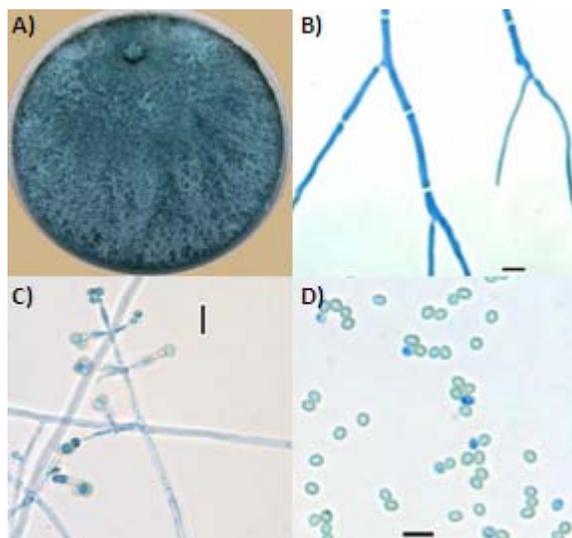


Figura 3.10. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CPTGC afín a *Trichoderma viride*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento, y D) esporas elipsoidales y globosas observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

La cepa CPX tiene afinidad con *T. atroviride* sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1992), aislamiento obtenido como una contaminación en cajas de Petri utilizadas en el laboratorio de microbiología de suelos del Colegio de Postgraduados. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa a 28 °C, la colonia inicialmente es de color blanco, cambiando desde un verde amarillento hasta verde oscuro, el reverso de la placa es incoloro. El micelio aéreo es granular. A los tres días alcanza 8.0 cm de diámetro. Presenta hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas con un ancho entre 1.56-5.52 μm . Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares, en algunos casos

se observa la formación de ramas laterales. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fiálides más o menos langeniformes y curvadas, se presentan de 2 a 4 verticilos, con verticilos terminales de hasta 4 fiálides con una longitud de 4.60 a 15.67 y 1.37 a 3.95 μm en su parte más ancha. Los conidios son verdes subglobosos de 2.57 a 4.28 μm de longitud y 1.72 a 3.62 μm de ancho (**Fig. 3.11**).

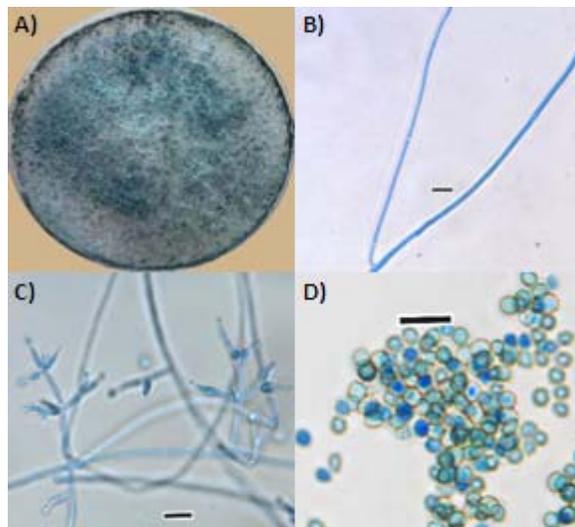


Figura 3.11. Apariencia macroscópica y microscópica de la cepa de *Trichoderma* CPX afín a *Trichoderma atroviride*. A) aspecto macroscópico del micelio, B) forma del micelio a las 24 h, C) estructuras microscópicas representativas de este hongo a las 48 h de su crecimiento y D) esporas subglobosas observadas a las 96 h. Barras=10 μm .

3.3.2. Caracterización molecular

3.3.2.1. Extracción de ADN y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los iniciadores de *Trichoderma* de las once cepas fúngicas

El ADN se aisló de los once aislamientos de *Trichoderma* (**Fig. 3.12**) con la técnica de González-Mendoza *et al.* (2010), empleando los iniciadores, **uTf** (5'-AACGTTACCAAAGTGTG-3') y **uTr** (5'-AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3') que amplificaron una región conservada de aproximadamente 500 pares de bases (**Fig. 3.13**).

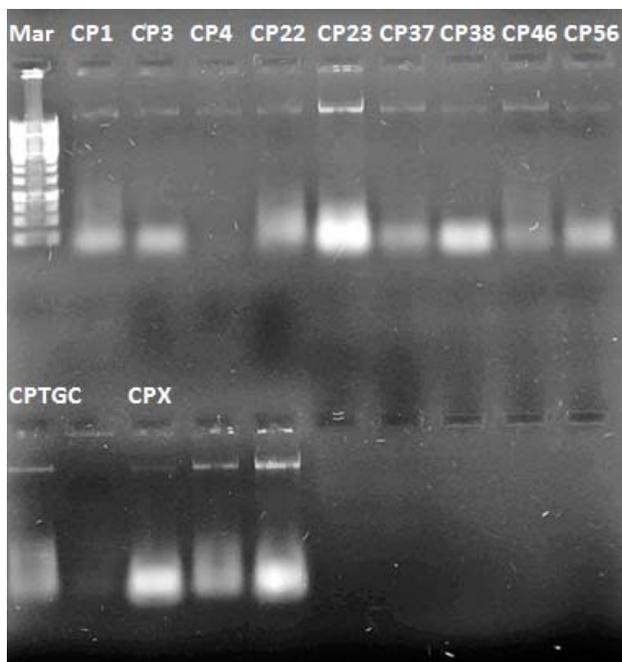


Figura 3.12. DNA obtenido de las once cepas de *Trichoderma* carril 1: marcador 1 kb (Fermentas®); carriles del 2 al 13: muestra de DNA de los aislamientos fúngicos en gel de agarosa al 1.0 %.

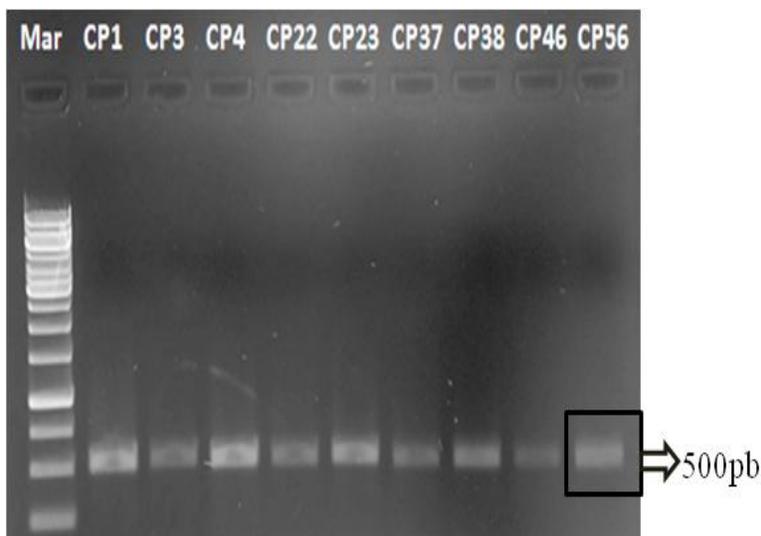


Figura 3.13. Productos de PCR de los aislamientos fúngicos, carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), carriles del 2 al 10: amplificaciones de los aislamientos fúngicos utilizando los iniciadores **uTf** y **uTr** para especies del género *Trichoderma* (500pb) en gel de agarosa al 1.0 %.

3.3.2.2. Secuenciación

Al comparar las secuencias de los fragmentos amplificados (Anexo I) con los iniciadores **uTf** (5'-AACGTTACCAAACCTGTTG-3') y **uTr** (5'-AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3'), con las registradas en el GENBANK, se encontró que las cepas fúngicas CP1, CP22, CP37 y CP46 presentan una homología del 99, 100, 100 y 93% con *Hypocrea virens/Trichoderma virens* respectivamente. Las cepas CP3 y CP23 tienen una homología del 91 y 95% con *Hypocrea koningii/Trichoderma koningii*, mientras que las cepas CP56 y CPTGC tienen una homología del 95% con *Trichoderma viride*; finalmente la cepa CPX, presenta una homología del 86% con *Trichoderma atroviride* (**Cuadro 3.2**).

CUADRO 3.2. AFINIDAD TAXONÓMICA Y HOMOLOGÍA GENÉTICA (comparación de sus secuencias en el Gen Bank) DE LAS ONCE CEPAS DE ESTUDIO

Cepa	Afinidad morfológica	Homología genética	No. de acceso
CP1	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i> strain GL-3	gb AF099006.1
CP22	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i> strain GL-20	gb AF099007.1
CP37	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i> strain GL-21	gb AF099008.1
CP46	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Hypocrea virens</i> strain GL-9	gb GU046494.1
CP4	<i>Trichoderma viride</i>	No identificada	
CP23	<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Hypocrea koningii</i> strain T45	gb GU176485.1
CP38	<i>Trichoderma harzianum</i>	No identificada	
CP56	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viride</i> strain T4	gb HQ259989.1
CP3	<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Hypocrea koningii</i> strain MF349	gb GU244589.1
CPTGC	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viride</i> strain T4	gb HQ259989.1
CPX	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i> strain BBA	emb AJ230660.1

A manera de discusión, el uso de herramientas moleculares ha permitido a la taxonomía de *Trichoderma* avanzar sustancialmente en los últimos años, hasta ahora, 88 taxones han sido recientemente redefinidos por la combinación de herramientas moleculares y genéticas (Druzhinina y Kubicek, 2005). Entre los 88 taxones, se tienen 14

relaciones anamorfo-teleomorfo que han sido demostradas y por lo tanto, son holomorfos, 49 han sido descritas en *Hypocrea*, mientras que las 25 restantes fueron descritas como *Trichoderma* (Chaverri *et al.*, 2003b; Kubicek *et al.*, 2003). En el caso de las especies descritas en el género *Hypocrea* y *Trichoderma*, la otra (sexual/asexual) forma no se ha encontrado en la naturaleza. Es posible (aunque improbable) que muchas de estas especies de *Hypocrea* se encuentran de forma natural en su estado de teleomorfo y hasta ahora muchas de las especies descritas de *Trichoderma* pueden carecer del estado de teleomorfo debido a la evolución clónica (Kuhls *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2004). Los estudios filogenéticos de estas 88 especies muestran que *Trichoderma* e *Hypocrea* forman un solo género holomorfo, dentro de los cuales los dos clados principales pueden ser distinguidos (Põldmaa, 2000; Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002).

De las once cepas de estudio, cuatro de ellas presentaron una afinidad morfológica a *Trichoderma virens*, aunque el análisis de sus secuencias nos muestra que se trata de *Hypocrea virens*. Esta información indica que se tienen cuatro especies fúngicas que pertenecen al género holomorfo *Hypocrea virens/Trichoderma virens*, aislados de diferentes estados de la República Mexicana, pero también se tienen dos especies fúngicas que pertenecen a otro género holomorfo formado por *Hypocrea koningii/Trichoderma koningii*, aisladas de dos sitios diferentes (Jalisco y Veracruz).

Desde hace mucho tiempo se ha tenido evidencia de la existencia de los holomorfos, Berkeley (1860) encontró que hay un vínculo entre *T. viride* y algunos ascomicetos sin nombre. En ese mismo año Tulasne (1860) demostró que *T. viride* y el ascomiceto *Hypocrea rufa* son expresiones de un ciclo de vida. Lo anterior representó un gran avance para la comprensión de la interrelación entre Deuteromicetes y Ascomicetes

(Samuels, 1996; Jaklitsch *et al.*, 2006). Aunque *Trichoderma virens* ha sido ordenada entre las especies de *Hypocrea* y por lo tanto, puede considerarse como una especie de *Hypocrea*, las especies de *Trichoderma* tienen todas las características esenciales de anamorfos del orden *Hypocreales* (Rehner y Samuels, 1995). Los teleomorfos del género *Trichoderma*, conocidos, son de los géneros *Hypocrea*, *Podostroma* y *Sarawakus* de la familia *Hypocreaceae* (Rossman *et al.* 1999).

Por otro lado, se observó una correlación entre el análisis morfológico y el análisis de secuencias de todas las cepas fúngicas estudiadas. Cabe mencionar que Kullnig-Gradinger *et al.* (2002) encontraron una correlación entre la filogenia y la morfología, tal es el caso del subclado B1 que contiene a *T. polysporum* y *T. croceum*, que son muy semejantes en su morfología. Sin embargo, esta correlación se contradice en otros casos; del mismo modo, otras especies muy similares morfológicamente (*T. oblongisporum* y *T. longipilis*; *T. spirale* y *T. fertilis*; *T. minutisporum* y *T. tomentosum*) presentan posiciones filogenéticamente separadas.

Finalmente Samuels (1996) mencionaba que en décadas pasadas aún no se conocía lo que era una especie de *Trichoderma*; sin embargo, en la actualidad, *Trichoderma* es uno de los hongos más investigados a fondo, desde el punto de vista taxonómico. Aunque las 88 especies recientemente caracterizadas por métodos moleculares están filogenéticamente bien soportadas, su evolución y relación filogenética ahora ha sido más difícil de resolver; esto refleja la falta de ancestros conocidos (como la mayoría de otros hongos), o la incidencia de una alta presión de selección durante la evolución de estos clados (Druzhinina *et al.*, 2006). Hay que destacar que estas 88

especies son probablemente sólo una pequeña fracción del número existente de taxones (Druzhinina y Kubicek, 2005).

3.4. CONCLUSIONES

El objetivo de este capítulo se cumplió por completo, encontrándose además, una alta correlación entre el análisis morfológico y el análisis genético entre las once cepas de estudio, lo cual permite concluir que ambos análisis son complementarios, a pesar de que muchos investigadores le den mayor validez al análisis genético.

CAPÍTULO IV

TOLERANCIA DE ONCE CEPAS DE *Trichoderma* A PETRÓLEO CRUDO, NAFTALENO, FENANTRENO Y BENZO[a]PIRENO

RESUMEN

Los hidrocarburos del petróleo (HP) son los principales contaminantes orgánicos en los suelos, cuyo proceso de degradación está mediado por microorganismos como los hongos filamentosos *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*. Sin embargo, poco se sabe acerca de la tolerancia y la capacidad de degradación de las especies de *Trichoderma* cuando se exponen a HP. Esta investigación evaluó la tolerancia y el crecimiento de 11 cepas de *Trichoderma* a petróleo crudo (PC), naftaleno (NAPH), fenantreno (PHE) y benzo[a]pireno (B[a]P) mediante el uso de sistemas in vitro. Cajas de Petri con medio mínimo mineral sólido fueron contaminadas por separado con PC, con siete dosis de NAPH y PHE (250, 500, 750, 1000, 2000, y 3000 mg L⁻¹) respectivamente y con seis dosis de B[a]P (10, 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹). Las cajas no contaminadas se utilizaron como controles. Las cepas de *Trichoderma* fueron expuestas a todos los contaminantes por triplicado, y el crecimiento de cada colonia fúngica se registró diariamente. No se observaron diferencias significativas entre las cepas de *Trichoderma* cuando fueron expuestas a PC, el crecimiento fúngico máxima se alcanzó a las 96 h. En contraste, las cepas de *Trichoderma* mostraron variaciones en su tolerancia y crecimiento bajo diferentes dosis de NAPH, PHE y B[a]P. El aumento en la dosis NAPH inhibió de forma significativa el crecimiento de los hongos. La exposición a B[a]P no inhibió el crecimiento de las cepas de *Trichoderma*.

Palabras clave: hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos policíclicos aromáticos, crecimiento fúngico

CHAPTER IV
TOLERANCE AND GROWTH OF 11 *Trichoderma* STRAINS TO
CRUDE OIL, NAPHTALENE, PHENANTHRENE AND
BENZO[a]PYRENE

ABSTRACT

Petroleum hydrocarbons (PH) are major organic contaminants in soils, whose degradation process is mediated by microorganisms such as the filamentous fungi *Cunninghamella elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. However, little is known about the tolerance and the degradation capability of *Trichoderma* species when exposed to PH. This research evaluated the tolerance and growth of eleven *Trichoderma* strains to crude oil (COil), naphthalene (NAPH), phenanthrene (PHE) and benzo[a]pyrene (B[a]P) by using in vitro systems. Petri dishes containing solid mineral minimum medium were separately contaminated with COil, with seven doses of either NAPH or PHE (250, 500, 750, 1000, 2000, and 3000 mg L⁻¹), and with six doses of B[a]P (10, 25, 50, 75, and 100 mg L⁻¹). Non-contaminated plates were used as controls. *Trichoderma* strains were exposed to all the contaminants by triplicate, and the growth of each fungal colony was daily recorded. No significant differences were observed among *Trichoderma* strains when they were exposed to COil in which the maximum fungal growth was reached at 96 h. In contrast, *Trichoderma* strains showed variations to tolerate and grow under different doses of either NAPH, PHE or B[a]P. Increasing NAPH doses resulted on significant greater fungal growth inhibition than PHE doses. The exposure to B[a]P did not inhibited growth of some *Trichoderma* strains.

Key words: petroleum hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, fungal growth

4.1. INTRODUCCIÓN

El petróleo se puede dividir en cuatro clases: 1) saturados, 2) aromáticos, 3) asfaltenos y 4) resinas (Leahy y Colwell, 1990; Harayama, 1997). Dentro de la clase de aromáticos se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que generalmente contienen dos o más anillos aromáticos con una variada configuración estructural. La estabilidad y la hidrofobicidad en las moléculas de los HPA son dos factores primarios que contribuyen a la persistencia de estos compuestos en el ambiente (Kanaly y Harayama, 2000). Desde el punto de vista de toxicidad, se sabe que estos compuestos son mutágenos y cancerígenos (Chen y Liao, 2006).

La biodegradación de los HPA por microorganismos está bien documentada, entre las bacterias resaltan los géneros *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Geobacter*, *Desulfobacterium* y *Metanospinillum*, por mencionar algunos (Widdel y Rabus, 2001). Por su parte, las especies de hongos frecuentemente estudiados en la biodegradación de HPA son *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* (Cerniglia y Yang, 1984; Bumpus, 1989; Sutherland *et al.*, 1991; Pothuluri *et al.*, 1992; Cerniglia *et al.*, 1994; Moen y Hammel, 1994). Con respecto al género *Trichoderma* hay pocos trabajos enfocados a aspectos de degradación de HPA.

Las especies del género *Trichoderma* conforman un grupo de hongos filamentosos clasificados como Ascomycetes pertenecientes al orden Hipocreales, de los que se conocen más de 30 especies (Lieckfel *et al.*, 1999). Estos hongos se caracterizan por ser muy abundantes en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas y micoparásitas. Además, tienen la

capacidad de colonizar distintos ambientes, debido a su alta tasa reproductiva (Bissett, 1991b; Harman *et al.*, 2004), y sus requerimientos nutrimentales son simples y sobreviven en condiciones adversas. El crecimiento de estos hongos es favorecido por la presencia de materia orgánica y humedad. Su temperatura óptima de crecimiento oscila en un rango de 25-30 °C (Papavizas, 1985).

El género *Trichoderma* es importante para las plantas, al contribuir en el control de organismos fitopatógenos, al poseer propiedades micoparasíticas y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes en el control de hongos causantes de enfermedades en diversas plantas hortícolas (Score y Palfreyman, 1994; Druzhinina y Kubicek, 2005; Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007).

Chaîneau *et al.* (1999) reportan que especies de *Trichoderma*, degradan con mayor facilidad hidrocarburos saturados en comparación con HPA, lo que sugiere que la estructura química del hidrocarburo influye en la capacidad de biodegradación por *Trichoderma*. El *n*-eicosano es degradado en 73% por *Trichoderma* sp. S019 empleando glucosa como fuente de C (Hadibarata y Tachibana, 2009). En contraste, *T. harzanium* tiene un potencial de degradación bajo ante la presencia de diesel en comparación con la bacteria *Bacillus subtilis* (Nwaogu *et al.*, 2008).

Por otro lado, el crecimiento de las especies *Trichoderma koningii* y *Trichoderma* sp. en presencia de hidrocarburos saturados y aromáticos disminuye drásticamente a 4 °C, mientras que a 17 °C su crecimiento es mayor (Hughes *et al.*, 2007). Otros autores, también han encontrado que la temperatura es un factor importante en el crecimiento y degradación de hidrocarburos (Whyte *et al.*, 1999). Sin embargo, algunas referencias indican que *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* y *T. viride* son capaces de degradar y

utilizar pireno como única fuente de C (Ravelet *et al.*, 2000; Saraswathy y Hallberg, 2002). Algunas especies de *Trichoderma* (incluyendo a *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. inhamatumson*) pueden tolerar hasta 100 mg L⁻¹ de fenantreno y pireno (Silva *et al.*, 2003). Atagana (2009) encontró que la degradación de benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]fluoranteno, Benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), criseno y fenantreno llevada a cabo por *Trichoderma* sp. es afectada por la presencia de Cd y Ni.

Este trabajo se enfocó a estudiar la tolerancia y crecimiento de 11 cepas de *Trichoderma* expuestas a petróleo crudo y a diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Cepas de *Trichoderma*

Las 11 cepas del hongo *Trichoderma* forman parte de la colección microbiana del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Colegio de Postgraduados. Las cepas fueron aisladas de siete muestras de suelo colectadas de los estados de: Jalisco, Oaxaca, Veracruz y Guanajuato (**Cuadro 4.1**). Los 11 aislados fueron caracterizados como antagonistas y micoparásitos de especies fúngicas de *Sclerotinia* (Ibarra-Medina *et al.*, 2010) y como degradadoras de residuos de la industria papelera (Baca y Ferrera-Cerrato, datos no publicados).

CUADRO 4.1. CLAVES Y LUGAR DE PROCEDENCIA DE ONCE AISLAMIENTOS FÚNGICOS.

Clave de la cepa	Afinidad con la especie	Lugar de aislamiento
CP1	<i>Trichoderma virens</i>	Jalisco
CP22	<i>Trichoderma virens</i>	Oaxaca
CP37	<i>Trichoderma virens</i>	Veracruz
CP46	<i>Trichoderma virens</i>	Guanajuato
CP4	<i>Trichoderma viride</i>	Jalisco
CP23	<i>Trichoderma koningii</i>	Jalisco
CP38	<i>Trichoderma harzianum</i>	Jalisco
CP56	<i>Trichoderma viride</i>	Jalisco
CP3	<i>Trichoderma koningii</i>	Veracruz
CPTGC	<i>Trichoderma viride</i>	Estado de México
CPX	<i>Trichoderma atroviride</i>	Estado de México

4.2.2. Tolerancia de cepas de *Trichoderma* a petróleo crudo

Para la activación del crecimiento de las cepas de *Trichoderma*, éstas se cultivaron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, discos individuales de PDA de cada cepa (7 mm de diámetro) se extrajeron con sacabocados y se colocaron en cajas de PDA impregnadas con 1 mL de petróleo crudo sobre su superficie. Las cajas sembradas se incubaron a 28 ± 2 °C por 10 días, período en que se midió el diámetro alcanzado por la colonia cada 24 h. Para los controles se utilizaron cajas de Petri con PDA sin petróleo crudo.

4.2.3. Tolerancia de cepas de *Trichoderma* a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno

La activación de las cepas se realizó de la misma forma que se mencionó anteriormente. Cada disco extraído de cada cepa, se colocó en el centro de una caja de Petri con medio mínimo que consistió (g L⁻¹): 0.1 CaCl₂; 0.2 KCl; 0.5 KH₂PO₄; 0.5 (NH₄)₂SO₄; 0.2 MgSO₄·7H₂O; 10 agar-agar, pH 5.5, y como fuente de C se adicionó

naftaleno y fenantreno en las siguientes dosis: 0, 250, 500, 750, 1000, 2000 y 3000 mg L⁻¹ respectivamente. El benzo[*a*]pireno se adicionó en las siguientes dosis: 0, 10, 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹, la razón de usar dosis menores es que este compuesto químico tiene mayor hidrofobicidad y estabilidad electroquímica que los otros compuestos usados en el estudio (Kanaly y Harayama, 2000), lo cual es reflejada en su alta toxicidad; por lo que los microorganismos expuestos a altas dosis de benzo[*a*]pireno requieren de mayor gasto energético para su desarrollo (Wilson y Jones, 1993), por lo que se trabajó con dosis bajas de este poliaromático.

Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a 28 ± 2 °C por 10 días, período en que se midió cada 24 h el diámetro alcanzado por la colonia. Para los controles se utilizaron cajas de Petri con el medio mineral sin el HPA. El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico por el efecto de los hidrocarburos se calculó con la siguiente ecuación:

$$FG(\%) = \frac{D_{PAH}}{D_C} \times 100 \quad (1)$$

$$FI(\%) = 100 - FG \quad (2)$$

Donde, FG es el porcentaje de crecimiento fúngico, D_{PAH} representa el diámetro fúngico de los tratamientos expuestos a los HPA en cada evaluación, D_C es el diámetro fúngico del control en cada evaluación y FI es el porcentaje de inhibición fúngica.

La velocidad de crecimiento micelial se calculó con la siguiente ecuación:

$$V = \frac{C}{t} \quad (3)$$

Donde, V es la velocidad de crecimiento micelial, C representa el diámetro de crecimiento fúngico y t es el tiempo de incubación.

4.2.4. Análisis estadístico

El diseño experimental empleado para las pruebas de tolerancia a petróleo crudo fue completamente al azar, donde los tratamientos fueron las 11 cepas de *Trichoderma*. Para las pruebas de tolerancia a naftaleno y fenantreno fue un diseño experimental completamente al azar utilizando un factorial 11x2x7 (11 cepas de *Trichoderma*, dos poliaromáticos y siete dosis de HPA). Para benzo[*a*]pireno se usó un factorial 11x6 (11 cepas de *Trichoderma* y seis dosis de benzo[*a*]pireno). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) con el programa estadístico SAS (SAS Institute 2002).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Tolerancia a petróleo crudo

Las 11 cepas de *Trichoderma* no presentaron inhibición de su crecimiento al ser expuestas a petróleo crudo, es decir no se encontraron diferencias significativas entre el control y las cepas crecidas en medio con petróleo crudo. La figura 4.1 muestra el crecimiento de dos cepas de *Trichoderma* CP46 (*T. virens*) y CP38 (*T. harzianum*) sobre el medio de cultivo con petróleo crudo, donde se observaron algunos cambios en la morfología macroscópica del hongo, en su crecimiento, producción de micelio y esporulación que son mayormente evidentes en los tratamientos totalmente cubiertos de petróleo crudo.

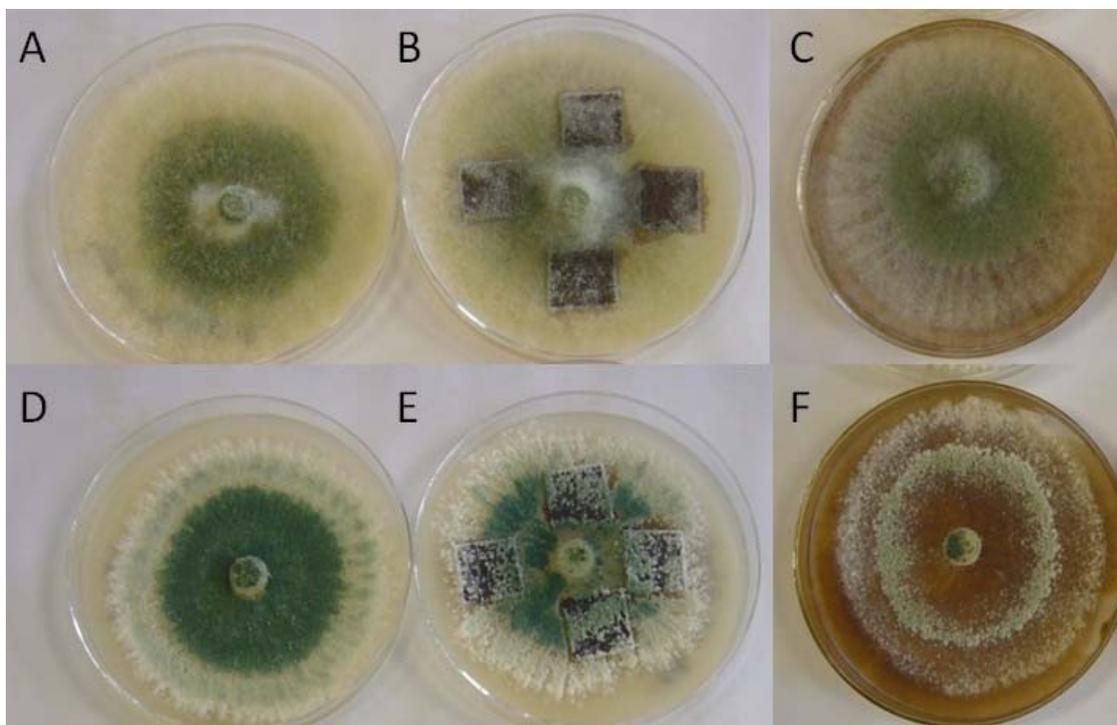


Figura 4.1. Tolerancia de *Trichoderma virens* (A-C) y *Trichoderma harzianum* (D-F) a petróleo crudo sobre el medio de cultivo, después de 96 h de incubación. A y D) crecimiento del hongo sin petróleo crudo (control), B y E) crecimiento del hongo en presencia de cuatro cuadros de papel filtro impregnados con petróleo crudo, y C y F) crecimiento del hongo en el medio de cultivo completamente cubierto con 1 mL de petróleo crudo.

A las 24 h, las cepas con mayor crecimiento fueron CP22 (*T. virens*) y CP1 (*T. virens*); mientras que a las 48 h, el crecimiento mayor se observó en las cepas CP37 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP1 (*T. virens*) (**Fig. 4.2** y **Fig. 4.3.**). A las 72 h, la mayoría de las cepas mostraron un crecimiento muy similar, excepto la cepa CPX (*T. atroviride*).

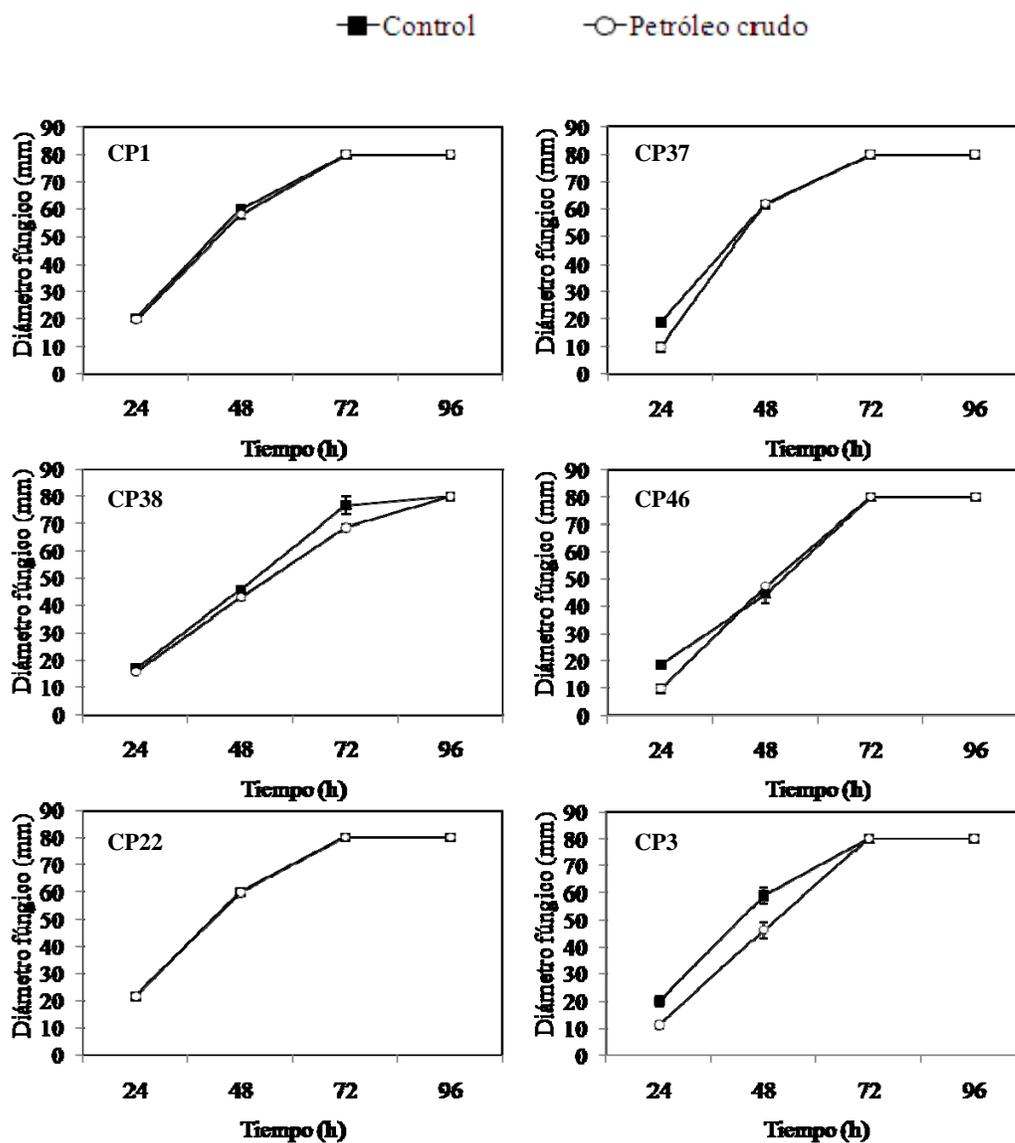


Figura 4.2. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a 1 mL de petróleo crudo. Las cepas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) muestran una tendencia similar de tolerancia. El crecimiento de la cepa CP22 (*T. virens*) fue similar a la de su testigo (n=3, Media \pm error estándar).

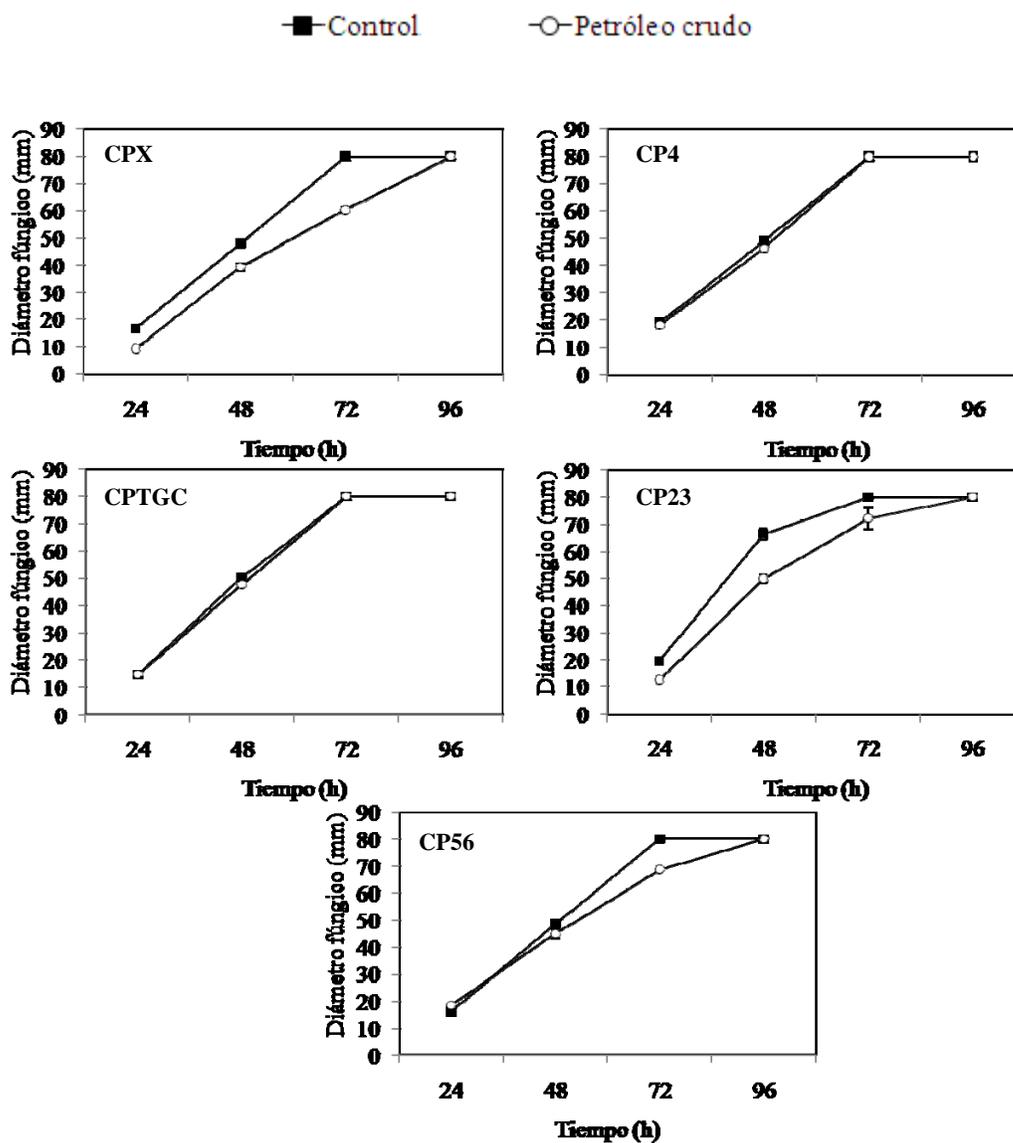


Figura 4.3. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a 1 mL de petróleo crudo. Las cepas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) muestran una tendencia un poco diferente de tolerancia. El crecimiento de las *Trichoderma* CP4 y CPTGC son casi iguales al de su control respectivo (n=3, Media \pm error estándar).

4.3.2. Tolerancia a naftaleno y fenantreno

Los factores independientes en estudio cepas fúngicas, compuestos poliaromáticos y dosis de hidrocarburo tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) en el crecimiento de

las cepas, estos efectos fueron observados principalmente a las 48 y 96 h. Analizando el tipo de HPA, se encontró que el naftaleno tuvo efectos significativos negativos ($P < 0.001$) sobre el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en comparación con el fenantreno. Lo anterior, indica que el naftaleno tuvo un mayor efecto inhibitorio (76%) sobre el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en comparación con fenantreno (11%). Por otro lado, el análisis estadístico del efecto de las dosis de HPA como un factor independiente, también mostró que las cepas de *Trichoderma* tuvieron una reducción significativa ($P < 0.001$) en su crecimiento, causado principalmente por el aumento la dosis del HPA. Dado que el número de tratamientos es muy grande (154) en el factorial (11x2x7), los resultados son presentados, mediante el análisis del crecimiento de las 11 cepas de *Trichoderma* con las siete dosis para cada HPA de forma individual. El naftaleno tuvo mayor efecto tóxico que el fenantreno en la mayoría de las cepas fúngicas, ya que sólo cinco de estas cepas crecieron ante 3000 mg L^{-1} , CP1 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*) y CP56 (*T. viride*). El crecimiento de los testigos fúngicos (0 mg L^{-1}) inició después de 24 h, mientras que el crecimiento de las cepas con mayor tolerancia a naftaleno fue observado después de las 48 h (**Fig. 4.4** y **Fig. 4.5**). La cepa CP1 (*T. virens*) mostró tolerancia a todas las dosis de naftaleno. A las 240 h, el crecimiento fúngico (diámetro) fue de más de 30 mm en la concentración de naftaleno mayor (3000 mg L^{-1}). En contraste, la cepa CP23 (*T. koningii*) no creció en ninguna de las dosis de naftaleno (**Fig. 4.5**). El fenantreno fue significativamente ($P < 0.001$) menos tóxico que el naftaleno, para las cepas fúngicas. A excepción de la cepa CP1 (*T. virens*) la cual no creció a 3000 mg L^{-1} (**Fig 4.6**), todas las cepas toleraron todas las dosis de fenantreno.

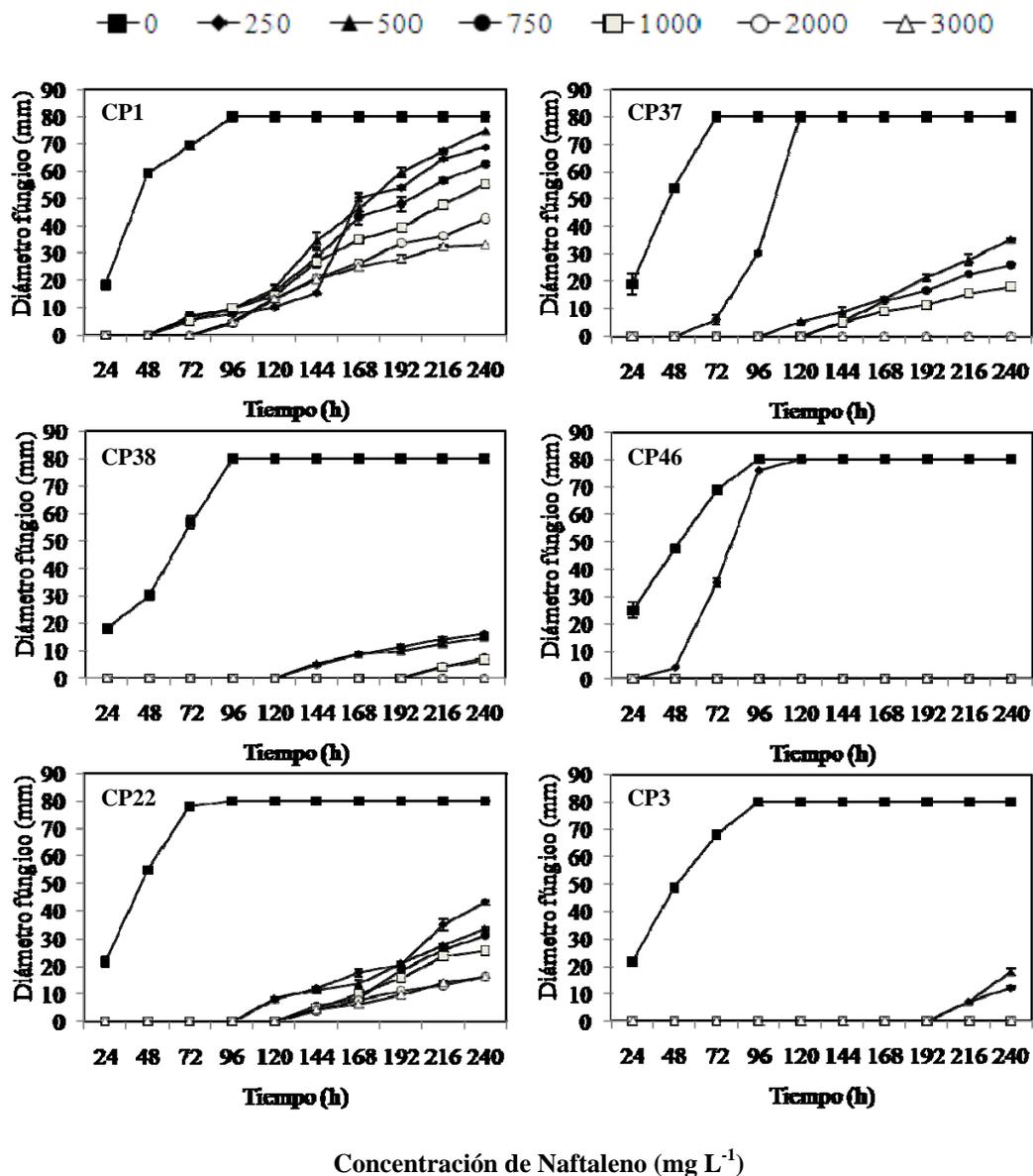


Figura 4.4. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de naftaleno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) muestran diferente tolerancia a dicho hidrocarburo. El crecimiento de la cepa CP3 fue fuertemente afectado por el naftaleno (n=3, Media \pm error estándar).

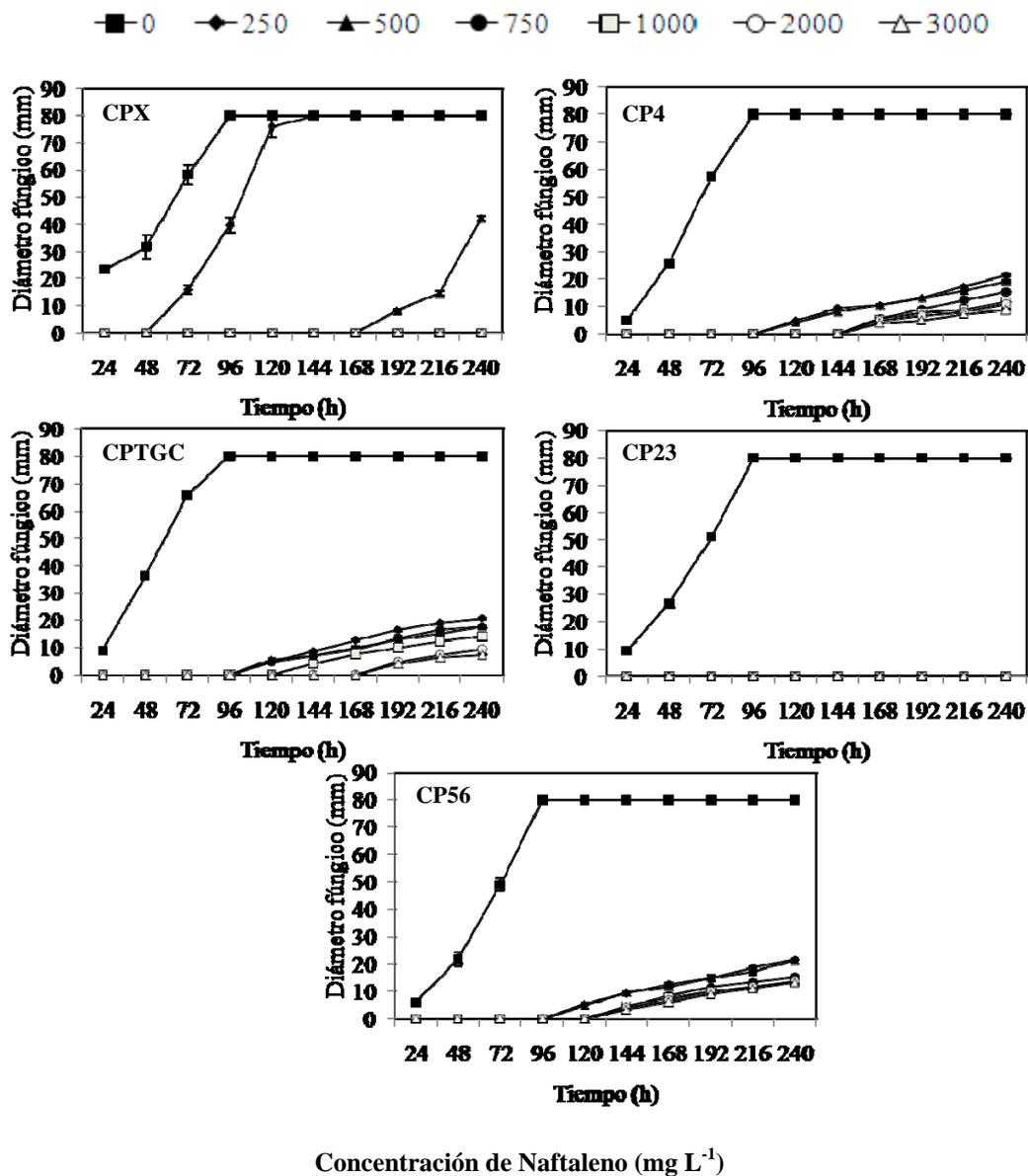
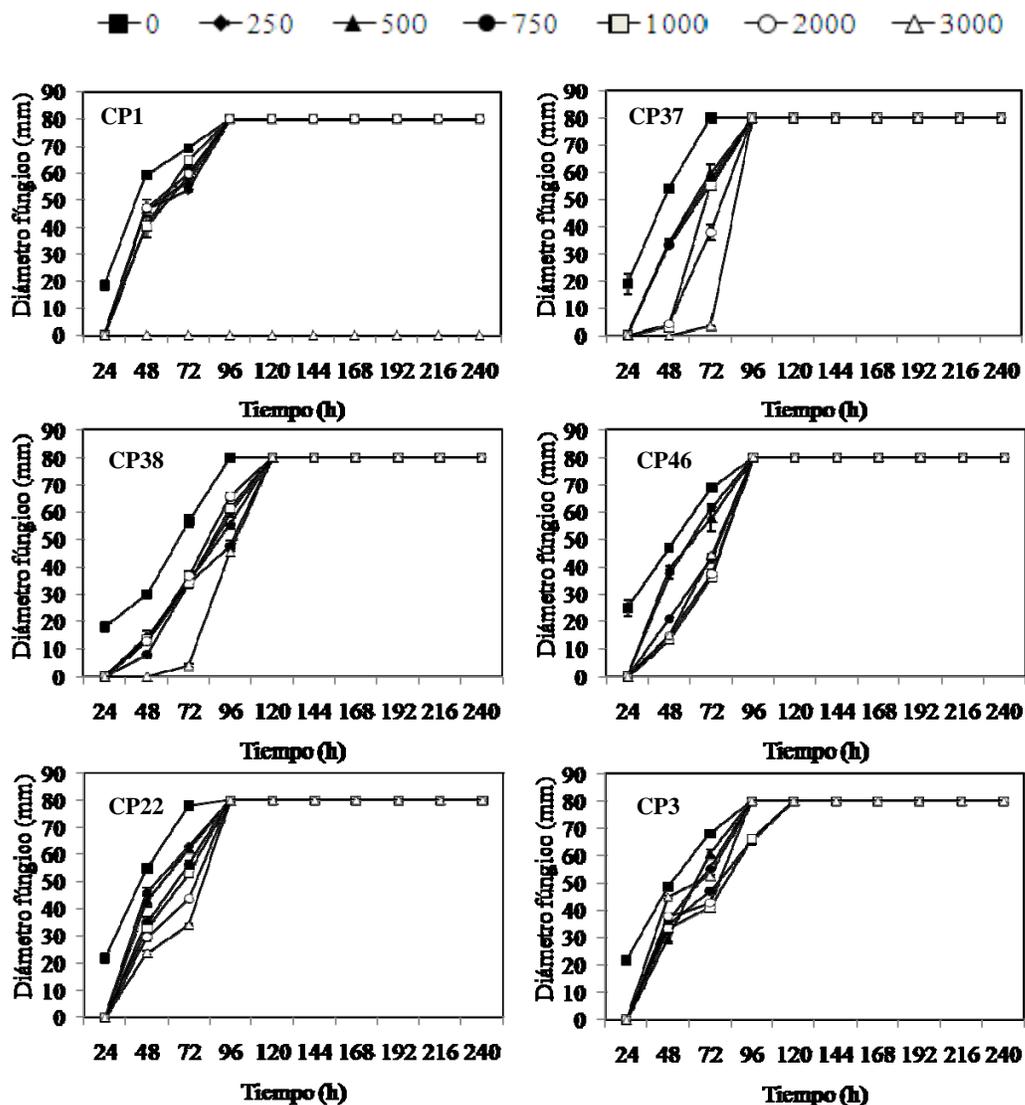
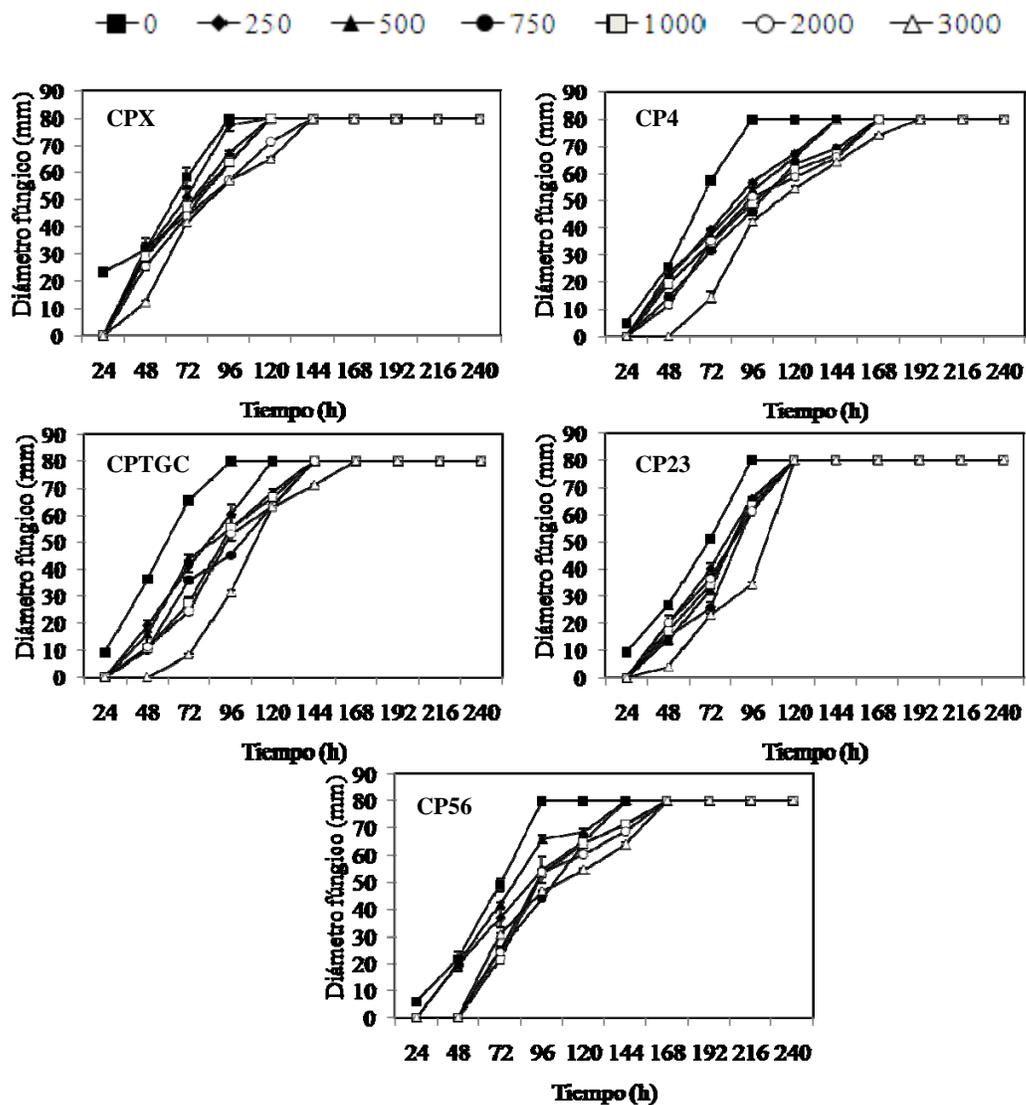


Figura 4.5. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de naftaleno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) muestran diferente tolerancia a dicho hidrocarburo. El crecimiento de la cepa CP23 fue fuertemente inhibido por el naftaleno (n=3, Media ± error estándar).



Concentración de Fenantreno (mg L^{-1})

Figura 4.6. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de fenantreno en medio de cultivo mínimo. Las cepas fúngicas probadas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) mostraron un crecimiento similar en este hidrocarburo. La mayoría de las cepas fúngicas llenaron la caja a las 96 h ($n=3$, Media \pm error estándar).



Concentración de Fenantreno (mg L⁻¹)

Figura 4.7. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a siete concentraciones de fenantreno en medio de cultivo mínimo. Las cepas fúngicas probadas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) mostraron un crecimiento similar en este hidrocarburo. La mayoría de estas cepas fúngicas llenaron la caja después de las 120 h (n=3, Media ± error estándar).

Las cepas CP37 (*T. virens*), CP46 (*T. virens*) y CP22 (*T. virens*) cubrieron completamente la caja de Petri a las 96 h, mientras que las cepas CP38 (*T. harzianum*), CP3 (*T. koningii*) y CP23 (*T. koningii*) alcanzaron su crecimiento mayor a las 120 h (**Fig.**

4.6 y Fig. 4.7). En contraste, las cepas CPX (*T. atroviride*), CPTGC (*T. viride*), CP56 (*T. viride*) y CP4 (*T. viride*) cubrieron la superficie de agar después de 144 h (Fig. 4.7).

La inhibición estimada para las cepas de *Trichoderma* debido a la exposición a fenantreno fue más bajo en comparación a naftaleno. El periodo de adaptación de las cepas de *Trichoderma* a fenantreno fue mas corto (72 h) que para naftaleno (>240 h). Las cepas CP1 (*T. virens*) y CP22 (*T. virens*) tuvieron una alta tolerancia tanto a naftaleno como a fenantreno (Fig 4.8 y Fig. 4.10).

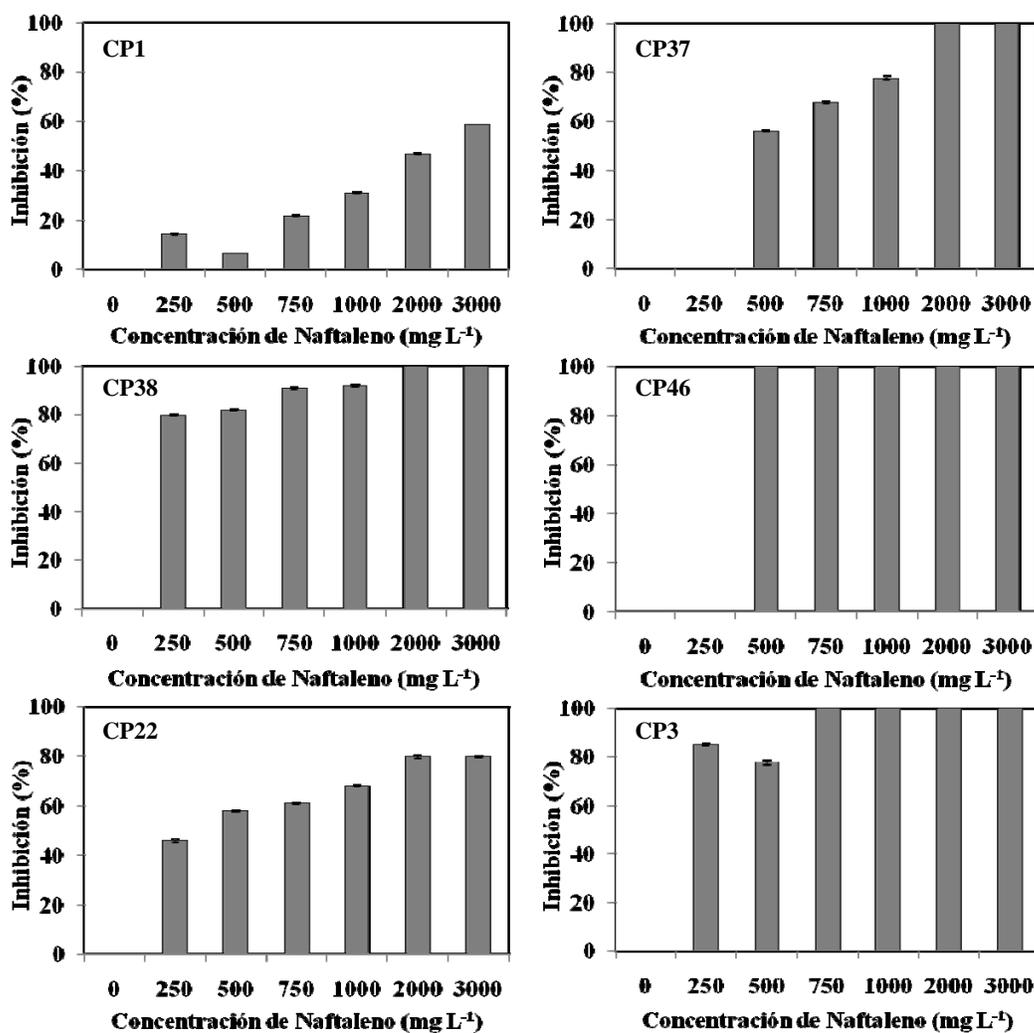


Figura 4.8. Inhibición de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a concentraciones crecientes de naftaleno, evaluado a las 240 h en medio de cultivo mínimo (n=3, Media \pm error estándar).

La inhibición del crecimiento de las cepas de *Trichoderma* fue más alta con naftaleno que con fenantreno (Figuras 4.8-4.11), se observaron inhibiciones del 100% en presencia de naftaleno a las 240 h de incubación; tal es el caso de la cepa CP23 (*T. koningii*) inhibida en todas las dosis probadas, así como las cepas CP3 (*T. koningii*) y CPX (*T. atroviride*) en las cuales se inhibe su crecimiento totalmente a partir de una dosis de 750 mg L⁻¹ de naftaleno (Fig 4.8 y Fig. 4.9).

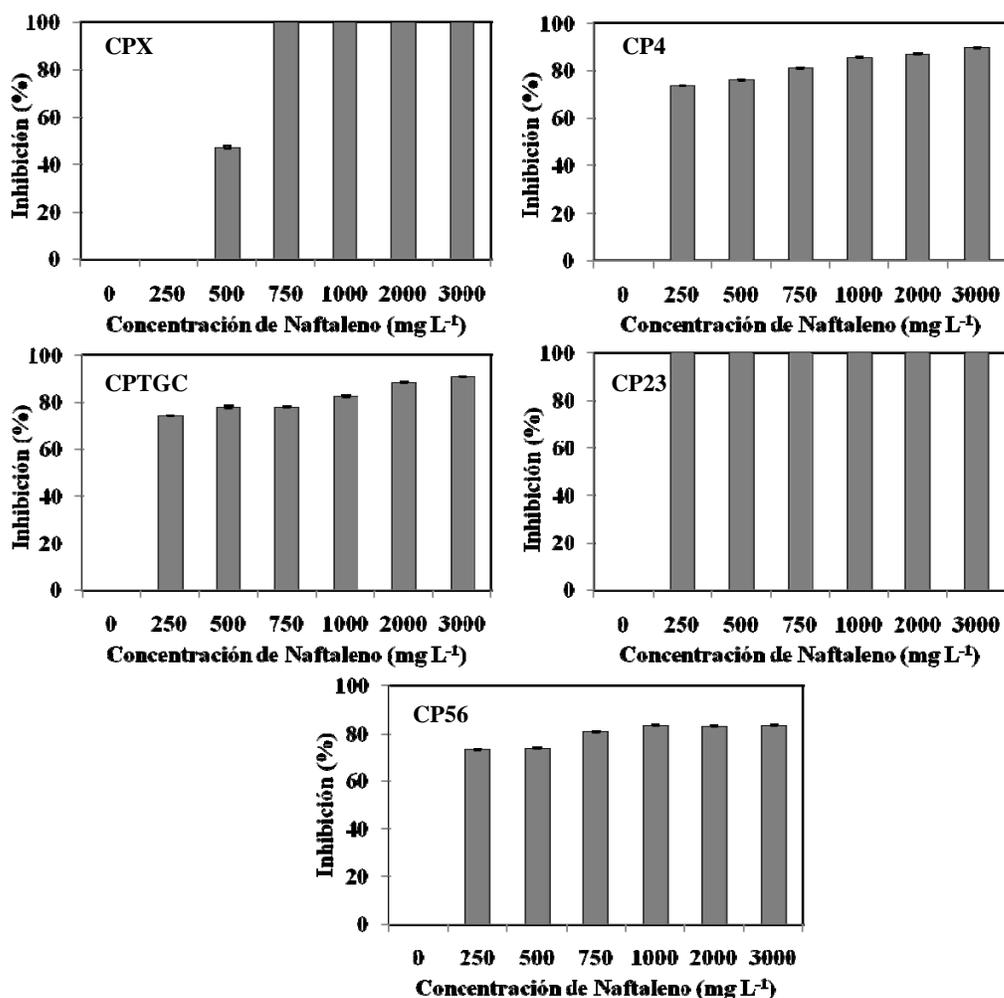


Figura 4.9. Inhibición de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a dosis crecientes de naftaleno (240 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar).

La dosis más alta de fenantreno (3000 mg L^{-1}) inhibió en 100, 96, 93 y 88%, respectivamente, el crecimiento de las cepas fúngicas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*) y CPTGC (*T. viride*), a las 72 h de incubación (**Fig 4.10** y **Fig. 4.11**).

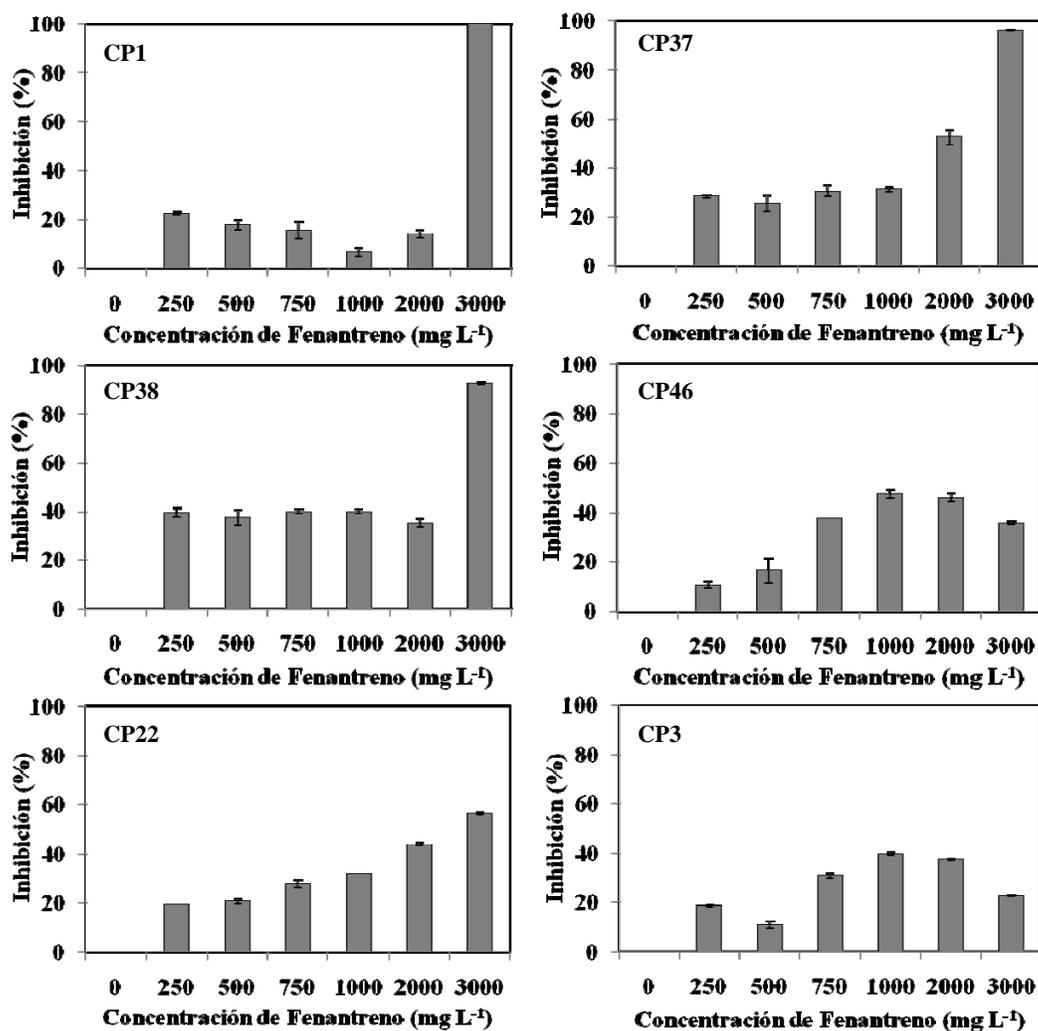


Figura 4.10. Inhibición de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a concentraciones crecientes de fenantreno (72 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media \pm error estándar).

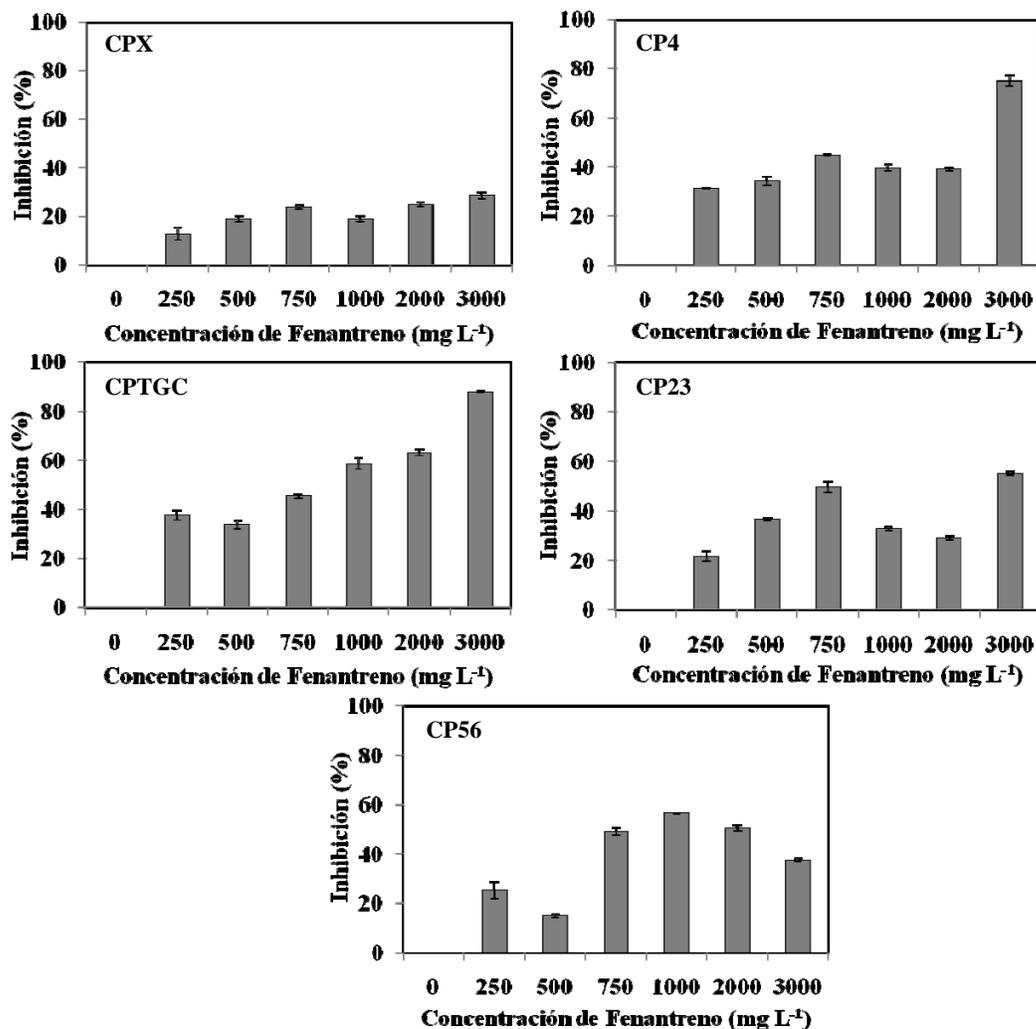


Figura 4.11. Inhibición de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a dosis crecientes de fenantreno (72 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar).

4.3.3. Tolerancia a benzo[a]pireno

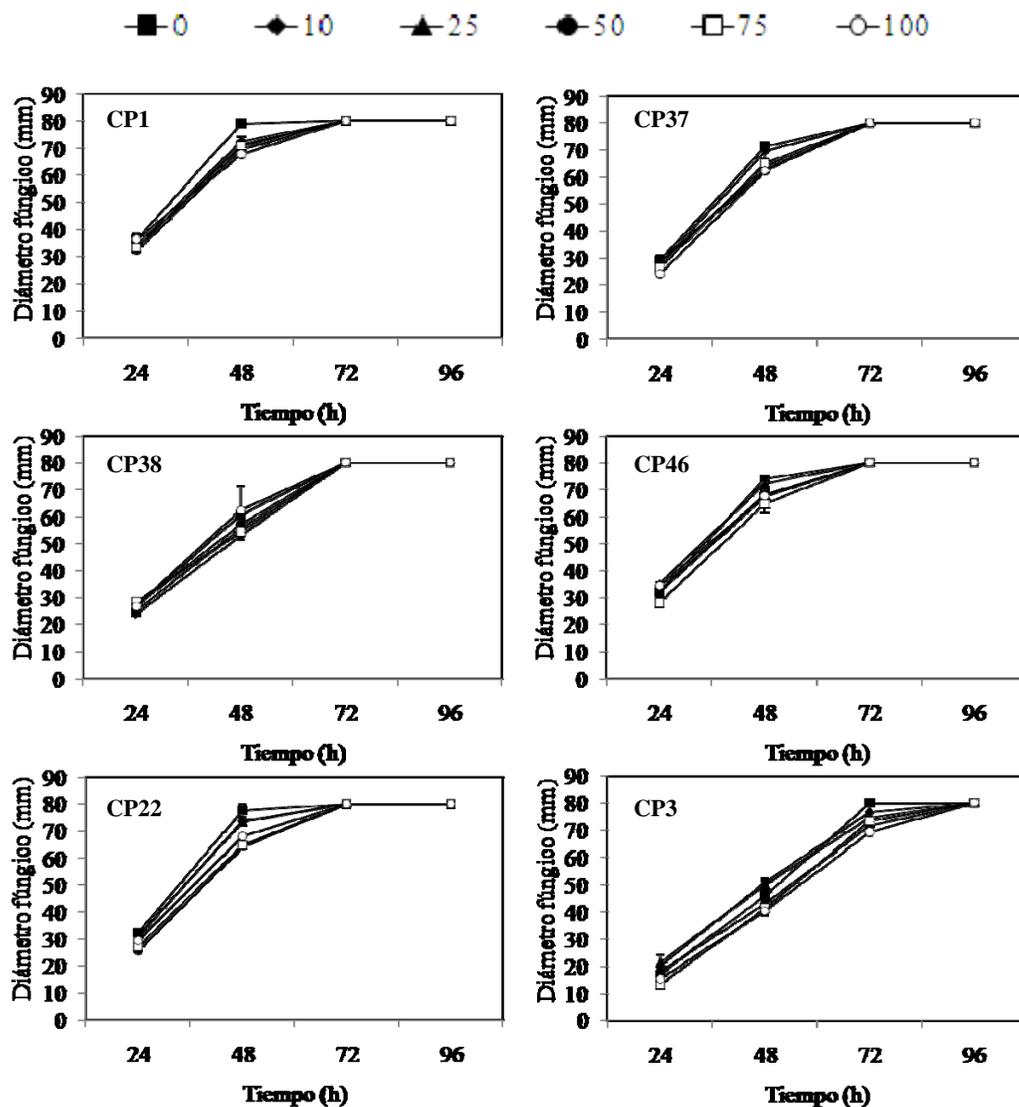
La respuesta de las cepas de *Trichoderma* a las concentraciones de benzo[a]pireno fue variada, sin embargo, se puede observar que causó menor toxicidad en comparación con los el naftaleno y el fenantreno, como lo demuestran sus curvas de crecimiento (**Fig. 4.12** y **Fig. 4.13**). El 50% de las cepas, CP1 (*T. virens*), CP4 (*T. viride*), CP22 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), y CP46 (*T. virens*) llenó la caja de Petri a las 72 h mientras que el otro 50% de las cepas, CPX (*T. atroviride*), CPTGC (*T. viride*), CP56 (*T.*

viride), CP23 (*T. koningii*) y CP3 (*T. koningii*) lo hizo a las 96 h. Es importante mencionar que se observó un fenómeno de estimulación en el crecimiento de varias cepas al exponerse a las diferentes dosis de benzo[*a*]pireno con respecto al crecimiento del testigo (**Cuadro 4.2**). Dicho fenómeno no se apreció en ninguna de las cepas en presencia de naftaleno y fenantreno.

Cuadro 4.2. ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGUNAS CEPAS DE *Trichoderma* EXPUESTAS A DIFERENTES DOSIS DE BENZO[*a*]PIRENO CON RESPECTO AL CRECIMIENTO DEL TESTIGO

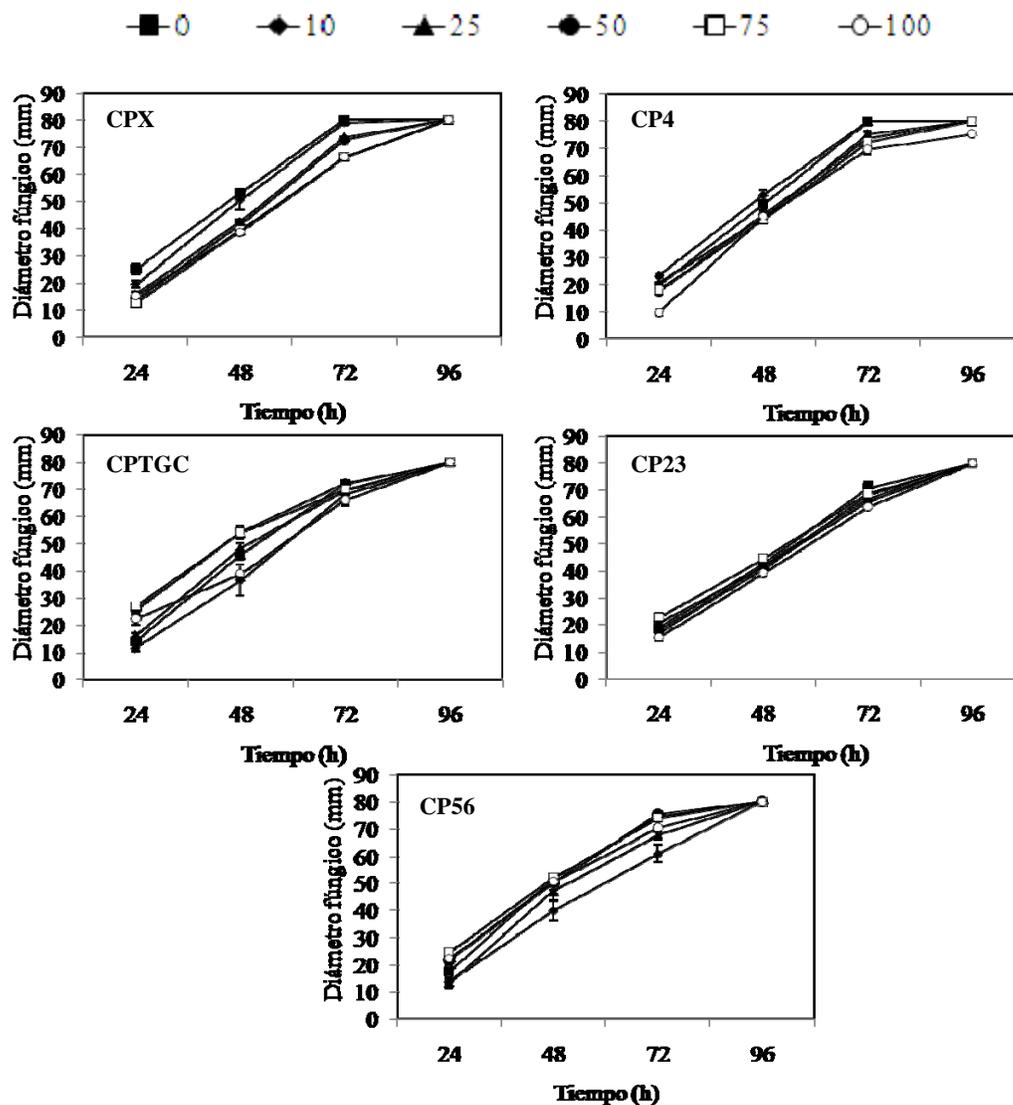
Cepa de <i>Trichoderma</i>	Porcentaje de estimulación del crecimiento con respecto al testigo (%)				
	10	25	50	75	100 (mg L ⁻¹)
CP3	10.9	8.7	---	---	---
CP4	6.7	---	---	---	---
CP38	---	---	---	---	2.7
CP46	9.9	7.4	1.1	---	0.5
CP23	---	---	---	4.7	---
CP56	---	---	---	0.6	---
CPTGC	---	5.1	18.1	17.4	---

A las 48 y 72 h, se observó una reducción significativa ($P \leq 0.001$) en el crecimiento de la mayoría de las cepas de *Trichoderma* con respecto al testigo debido a las dosis de benzo[*a*]pireno, sin embargo, las cepas fúngicas cubrieron completamente la superficie del agar entre 72 y 96 h. Las cepas CP1 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP46 (*T. virens*) fueron las cepas más tolerantes a benzo[*a*]pireno (**Fig. 4.12**).



Concentración de Benzo[a]pireno (mg L⁻¹)

Figura 4.12. Crecimiento de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a seis concentraciones de benzo[a]pireno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*) y CP3 (*T. koningii*) muestran un crecimiento similar en presencia de este poliarómico. La mayoría de éstas llenaron la caja a las 96 h (n=3, Media ± error estándar).



Concentración de Benzo[a]pireno (mg L⁻¹)

Figura 4.13. Crecimiento de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a seis concentraciones de benzo[a]pireno en medio de cultivo mínimo. Las cepas CPX (*T. atroviride*), CP4 (*T. viride*), CPTGC (*T. viride*), CP23 (*T. koningii*) y CP56 (*T. viride*) muestran diferente tolerancia a dicho poliaromático. La mayoría de estas cepas de *Trichoderma* llenaron la caja a las 96 h (n=3, Media ± error estándar).

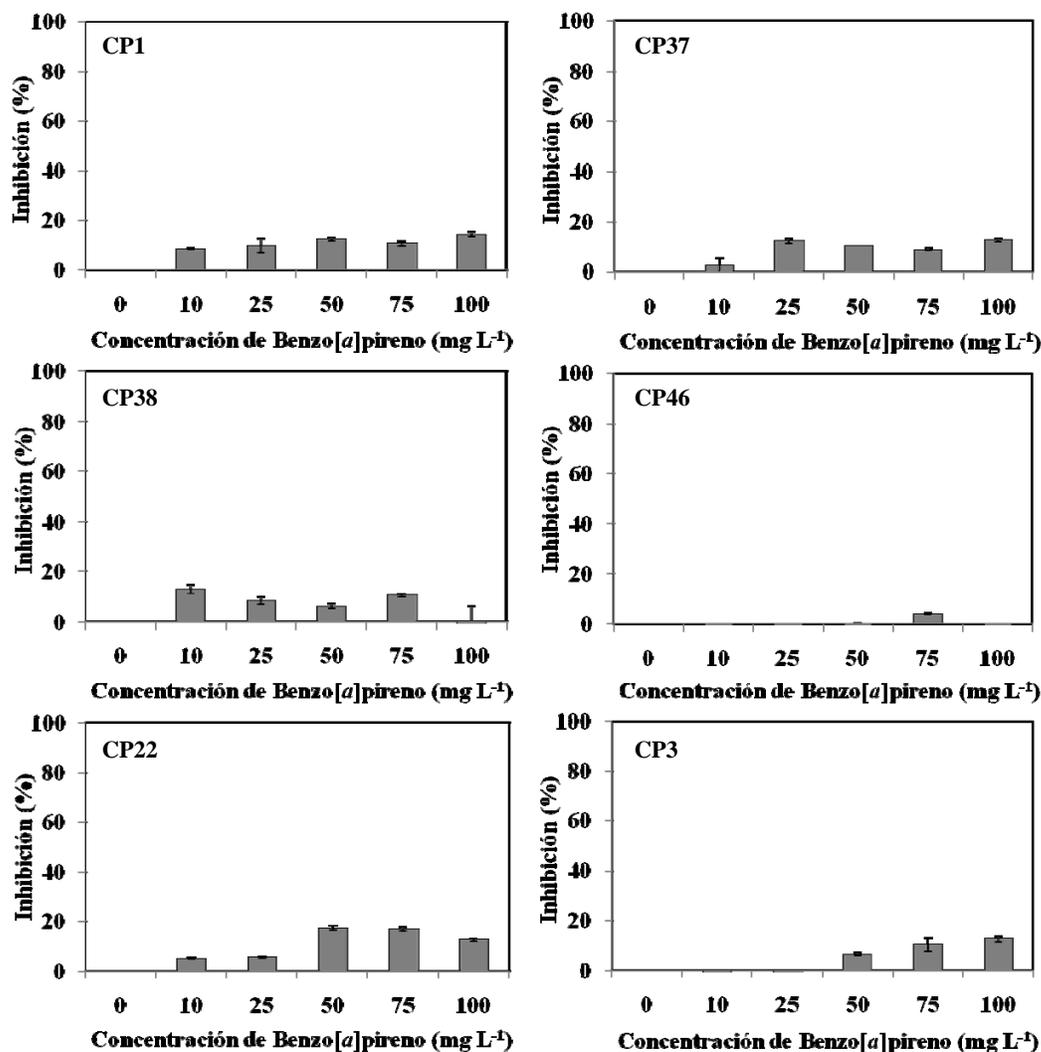


Figura 4.14. Inhibición de seis cepas de *Trichoderma* expuestas a dosis crecientes de benzo[*a*]pireno (48 h) en medio de cultivo mínimo (n=3, Media \pm error estándar).

El crecimiento de las cepas fúngicas presentó baja inhibición en las diferentes dosis de benzo[*a*]pireno probadas, aunque el crecimiento de la cepa CPX (*T. atroviride*) presentó mayor inhibición con las diferentes dosis de benzo[*a*]pireno (Fig. 4.14 y Fig 4.15).

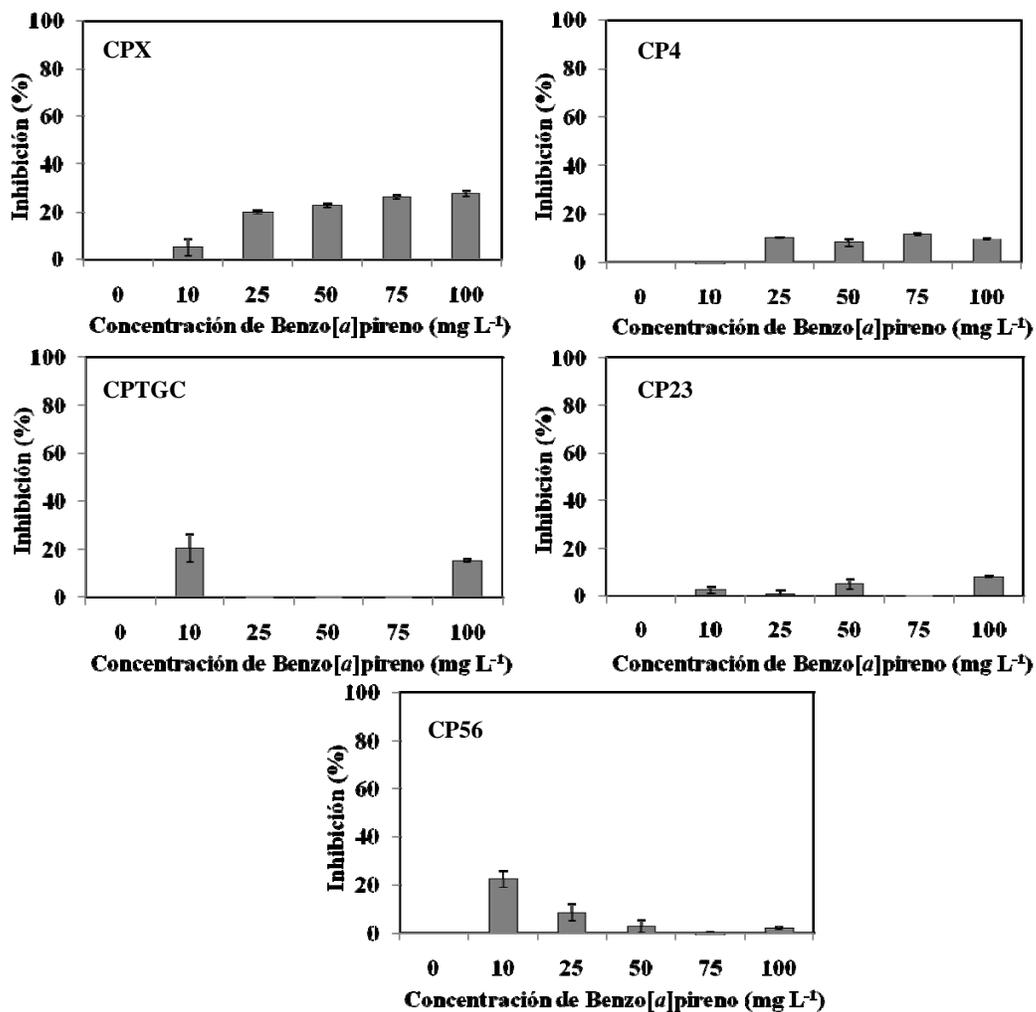


Figura 4.15. Inhibición de cinco cepas de *Trichoderma* expuestas a dosis crecientes de benzo[a]pireno (48 h) en un medio de cultivo mínimo (n=3, Media ± error estándar).

4.3.4. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas fúngicas en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno

El crecimiento por día de las cepas fúngicas fue menor en presencia de naftaleno. La cepa CP1 (*T. virens*) expuesta a naftaleno disminuye su crecimiento micelial al aumentar la dosis de naftaleno (Fig. 4.16).

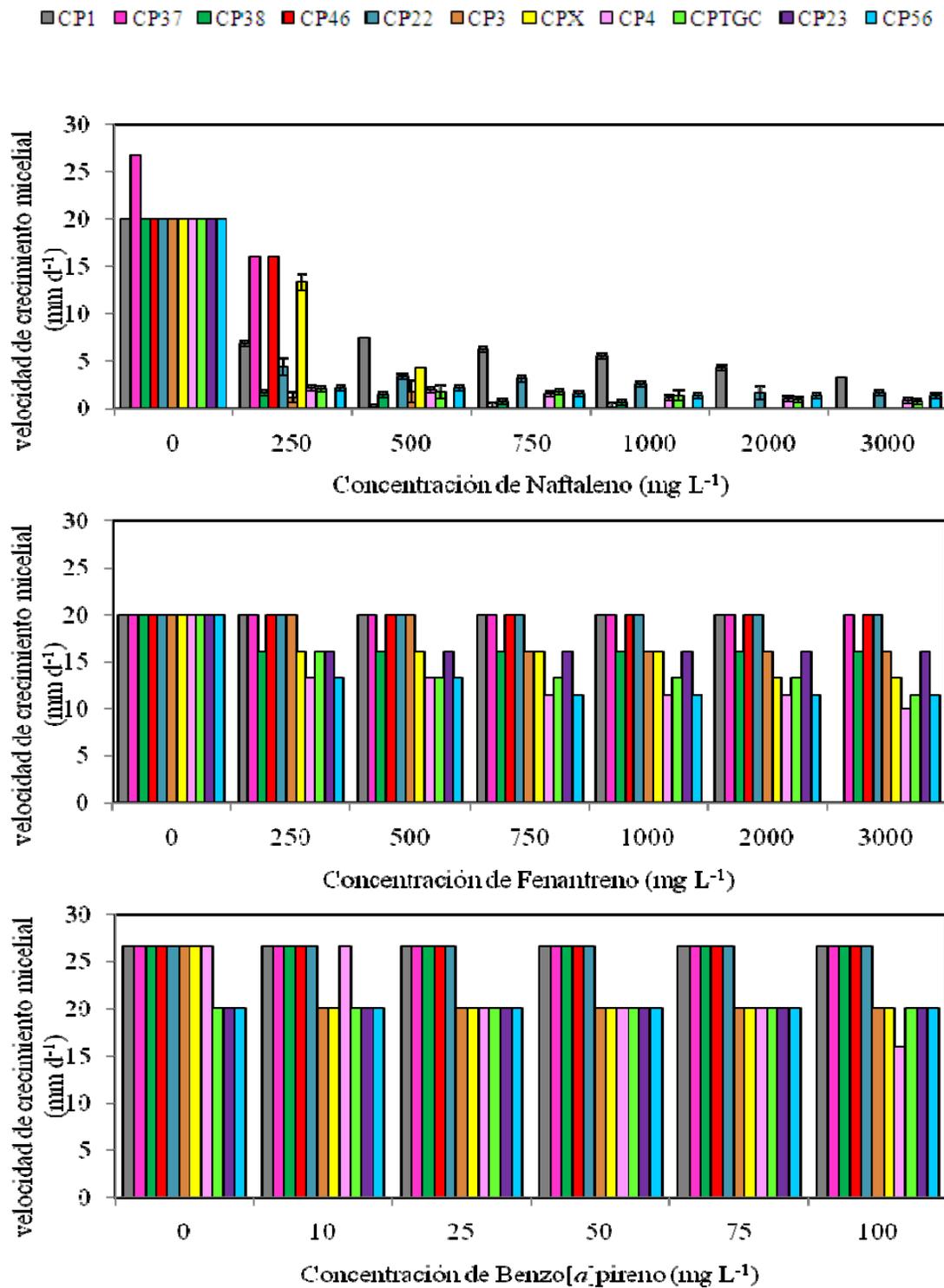


Figura 4.16. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* expuestas a los tres poliaromáticos (n=3, Media ± error estándar).

Sin embargo, la velocidad de crecimiento micelial en los testigos y las cepas CP37 (*T. virens*), CP46 (*T. virens*) y CP22 (*T. virens*) expuestas a fenantreno fueron iguales (20 mm d^{-1}). Esta respuesta en la velocidad del crecimiento también se observó para las cepas CP1 (*T. virens*), CP37 (*T. virens*), CP38 (*T. harzianum*), CP46 (*T. virens*), CP22 (*T. virens*), CP23 (*T. koningii*), CP56 (*T. viride*) y CPTGC (*T. viride*), pero en presencia de benzo[a]pireno.

El presente trabajo representa uno de los pocos estudios enfocados en la evaluación de la tolerancia de las especies de *Trichoderma* a hidrocarburos del petróleo como el petróleo crudo y los HPA (con dos, tres y cinco anillos aromáticos). Particularmente enfocado a estudiar cepas de *Trichoderma* bajo altas concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno. Este trabajo demuestra que las cepas de *Trichoderma* son capaces de crecer en medios de cultivo contaminados con petróleo crudo, pero expresan ciertos cambios morfológicos macroscópicos en su colonia y hábito de esporulación. Estos cambios fueron mayormente observados en presencia de los HPA, los cuales indujeron un fino micelio y poca esporulación. Lo anterior permite inferir que la tolerancia de *Trichoderma* está en función de la especie fúngica, del medio de cultivo empleado, el tipo y la concentración del hidrocarburo de petróleo.

Debido a la escasa información sobre el estudio del género *Trichoderma* bajo condiciones de contaminación con hidrocarburos del petróleo, ha sido imposible comparar los resultados de tolerancia a petróleo crudo e HPA, de las 11 cepas de *Trichoderma* con otras investigaciones. Sin embargo, el presente estudio indica que algunas de las cepas de *Trichoderma* son toleran dosis altas de naftaleno y fenantreno (más de 250 mg L^{-1}), así como dosis menores de 100 mg L^{-1} de benzo[a]pireno.

Los resultados muestran que el naftaleno tuvo mayor efecto tóxico que el fenantreno y el benzo[a]pireno sobre las especies fúngicas. Debido a la naturaleza química de estos tres compuestos poliaromáticos, se esperaba que el compuesto con una molécula más compleja como el benzo[a]pireno (cinco anillos aromáticos) tuviera una mayor inhibición en el crecimiento de las cepas de *Trichoderma*. Sin embargo, el compuesto con dos anillos aromáticos (naftaleno) fue el que causó la mayor inhibición sobre el crecimiento de las cepas de *Trichoderma*. El efecto negativo del naftaleno sobre el crecimiento del hongo puede ser explicado en parte debido a las propiedades fisicoquímicas de este compuesto tales como la presión de vapor, lo cual hace que esta sustancia sea muy propensa a evaporarse. La presión de vapor para el naftaleno es de 0.23 mm Hg a 25°C, la cual es considerablemente mayor que el fenantreno (6.8×10^{-4}) y el benzo[a]pireno (5.6×10^{-9}) (Oja y Suuberg, 1998; Goldfarb y Suuberg, 2008).

El efecto tóxico del naftaleno sobre el crecimiento del hongo puede correlacionarse con la presión de vapor de este compuesto químico cuando se compara con lo observado con fenantreno y benzo[a]pireno, ya que las cepas fúngicas estuvieron en un sistema cerrado en el cuál los vapores de naftaleno pudieron acumularse y afectar negativamente el crecimiento de las cepas de *Trichoderma*.

Aunque, las especies de *Trichoderma* muestran alta tolerancia a petróleo crudo e HPA, su capacidad para degradar estos compuestos orgánicos es controversial. Se sabe que la oxidación de los HPA por hongos filamentosos esta relacionada con su actividad enzimática como peroxidasas y lacasas (Cerniglia y Yang, 1984; Cerniglia *et al.*, 1989; Sutherland., 1991; Dhawale *et al.*, 1992; Hammel *et al.*, 1992; Pothuluri *et al.*, 1992); no obstante, no hay ninguna publicación científica que describa que enzimas están

relacionadas con la degradación de HPA para las especies del género *Trichoderma*. Sin embargo, investigaciones recientes indican que algunas especies de *Trichoderma* pueden contribuir en la degradación (72%) de 0.1 mM ($\approx 17.8 \text{ mg L}^{-1}$) de fenantreno en cultivos líquidos (Hadibarata *et al.*, 2007) vía liberación de enzimas oxidativas específicas (benceno dioxigenasa, monofenol monooxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, naftaleno 1,2-dioxigenasa, bifenil dioxigenasa, lacasa, peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso y lignino peroxidasa) las cuales participan en el primer paso de la degradación aeróbica de los HPA (Resnick *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1999; Gramss *et al.*, 1999).

Matsubara *et al.* (2006) indican que el crecimiento de *T. harzianum* es afectado negativamente por la presencia de pireno y fenantreno, resultando en una baja degradación de estos compuestos poliaromáticos (<10%) en comparación con dos hongos lignolíticos (basidiomycetes) como *Pycnoporus coccineus* y *Coprinus cinereus* que presentan una degradación de alrededor del 65-85%. Por otro lado, *T. viride* ha mostrado degradar 50% de benzo[a]pireno 0.04 mM $\approx 10 \text{ mg L}^{-1}$, sin presentar actividad peroxidasa ni lacasa (Verdin *et al.*, 2004). Con los resultados obtenidos (**Cuadro 4.3**), se hipotetiza que las cepas altamente tolerantes (CP1, CP4, CP37 y CPX) pueden tener una contribución significativa en la degradación de cualquiera de los HPA probados.

En resumen, las actividades enzimáticas y las respuestas fisiológicas de las especies de *Trichoderma* bajo sistemas contaminados con hidrocarburos poliaromáticos son desconocidas.

CUADRO 4.3. TOLERANCIA DE ONCE CEPAS DE *Trichoderma* A PETRÓLEO CRUDO, NAFTALENO, FENANTRENO Y BENZO[*a*]PIRENO.

Cepa	Sección†	Afinidad con la especie	Contaminante	Tolerancia
CP1	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+++
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	+++
CP22	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+++
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	+++
CP37	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	++
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CP46	<i>Pachybasium</i>	<i>Trichoderma virens</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	+++
CP4	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+++
			Fenantreno	+
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CP23	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	-
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CP38	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	++
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CP56	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+++
			Fenantreno	++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CP3	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+
			Fenantreno	+++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CPTGC	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+++
			Fenantreno	++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++
CPX	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	Petróleo	+++
			Naftaleno	+
			Fenantreno	++
			Benzo[<i>a</i>]pireno	++

*La tolerancia se evaluó empleando cuatro criterios, alta tolerancia (+++), mediana tolerancia (++), baja tolerancia (+) y no tolerancia (-). † Sección taxonómica del género *Trichoderma* (Bissett *et al.*, 1991).

Por lo anterior, se necesitan mas estudios para determinar el papel que tienen las especies de *Trichoderma* en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos, además se requiere evaluar la actividad enzimática involucrada en la detoxificación de compuestos orgánicos, tomando como base los reportes encontrados para hongos filamentosos tales como *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* (Cerniglia *et al.*, 1989; Sutherland *et al.*, 1991; Dhawale *et al.*, 1992; Hammel *et al.*, 1992).

Esta fase experimental permitió seleccionar cepas prominentes para ser utilizadas en sistemas de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos.

4.4. CONCLUSIONES

Las 11 cepas de *Trichoderma* difirieron sobre su tolerancia y crecimiento en un medio de cultivo contaminado con petróleo crudo y principalmente, cuando son expuestas a dosis crecientes de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno. La exposición de los hongos a dosis crecientes de naftaleno generó una inhibición drástica en el crecimiento de todas las cepas de *Trichoderma* en comparación con los efectos por las dosis crecientes de fenantreno y benzo[*a*]pireno. Finalmente, en este estudio se encontraron cuatro cepas prominentes de *Trichoderma*; CP1 (*Trichoderma virens*), CP4 (*Trichoderma viride*), CP37 (*Trichoderma virens*) y CPX (*Trichoderma atroviride*) con alta tolerancia a compuestos poliaromáticos.

CAPÍTULO V

BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS POR *Trichoderma virens* Y *Trichoderma viride*

RESUMEN

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) son un grupo diverso de más de 100 compuestos orgánicos que tienen dos o más anillos aromáticos, con alta recalcitrancia en el ambiente. La importancia de su estudio radica en que son sustancias que perjudican la salud humana pues son agentes cancerígenos y mutágenos. La biodegradación de HPA por hongos filamentosos se ha enfocado principalmente a *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, por mencionar algunos. Los estudios de biodegradación de HPA por especies del género *Trichoderma* son muy escasos por lo que este trabajo evaluó la capacidad que tienen dos especies del género *Trichoderma* para biodegradar naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno en medio mineral líquido. La cepa fúngica CP4 (*T. viride*) mostró mayor porcentaje de degradación de HPA en comparación con la cepa fúngica CP1 (*T. virens*). Así, la degradación de naftaleno fue de 55 y 40%, la degradación de fenantreno fue de 39 y 31%, y la degradación de benzo[*a*]pireno fue de 61 y 31% por las cepas CP4 y CP1, respectivamente. Bajo las condiciones de cultivo probadas, las dos cepas de *Trichoderma* poseen un potencial de degradación aceptable para naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno. Además, la modificación de las condiciones del medio de cultivo podría favorecer la eficiencia de degradación de los HPA.

Palabras clave: *Trichoderma*, biodegradación, naftaleno, fenantreno, benzo[*a*]pireno

CHAPTER V

BIODEGRADATION OF POLYAROMATIC COMPOUNDS BY *Trichoderma virens* AND *Trichoderma viride*

ABSTRACT

Polyaromatic hydrocarbons (PAH) are a diverse group that includes more than 100 organic compounds with two or more aromatic rings, and highly recalcitrance in the environment. The importance of the PAH-study lays on their potential risks for human health due to carcinogenic and teratogenic properties. The biodegradation of PAH by filamentous fungi has been focused on species such as *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, among others. In contrast, the studies of PAH-biodegradation by *Trichoderma* species are scarce, thus, this research evaluated the capability of two *Trichoderma* species to degrade naphthalene, phenanthrene, and benzo[*a*]pyrene in a liquid media. The fungal strain CP4 (*T. viride*) showed higher PAH-degradation percentages than the strain CP1 (*T. virens*). Thus, the naphthalene degradation for both strains were 55 and 40%, respectively, while the degradation for phenanthrene was 39 and 31%, and for benzo[*a*]pyrene was 61 and 31%, respectively. Under the experimental conditions, the two *Trichoderma* strains have an acceptable potential for degrading naphthalene, phenanthrene or benzo[*a*]pyrene. In addition, the modifications of cultural conditions for the liquid media may favor the efficiency of PAH-degradation.

Key words: *Trichoderma*, biodegradation, naphthalene, phenanthrene, benzo[*a*]pyrene

5.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos poliaromáticos son un grupo diverso de mas de 100 compuestos orgánicos que tienen dos o más anillos aromáticos y que son termodinámicamente estables debido a su energía de resonancia negativa, de ahí su alta recalcitrancia en el ambiente. Son poco solubles en agua, por lo tanto tienen una hidrofobicidad y presentan una distribución ubicua. La importancia de su estudio radica en que son sustancias que perjudican la salud humana pues son agentes cancerígenos y mutágenos (Palhmann y Pelkonen, 1987; Manilal y Alexander, 1991; Kanaly y Harayama, 2000; Toyooka y Ibuki, 2007). Estos compuestos son generados por diferentes procesos industriales y combustiones incompletas de la materia orgánica, y se pueden mencionar como ejemplos, el naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, benz[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, entre otros (Edwards, 1983; Maliszewska-Kordybach, 1999). El naftaleno tiene dos anillos aromáticos, éste se encuentra en el alquitrán de hulla, es insoluble en agua, muy volátil y tiene un olor característico, y se emplea como germicida e insecticida, y en la preparación de una gran variedad de derivados (Stohs *et al.*, 2002; Fradin *et al.*, 2005). Además, este compuesto es sumamente tóxico para algunos organismos marinos como peces, mejillones, gastrópodos, etc. (Sutherland, 1992). El benzo[*a*]pireno está formado por cinco anillos aromáticos y es un potente agente genotóxico, cancerígeno y mutageno (Denissenko *et al.*, 1996).

La biodegradación de los compuestos poliaromáticos por hongos filamentosos se ha enfocado principalmente al uso de *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Pleurotus ostreatus*, etc. (Sutherland *et al.*, 1991; Cerniglia *et al.*, 1994; Moen y Hammel, 1994; Bezalel *et al.*, 1997; Sack *et al.*,

1997: April *et al.*, 2000; Verdin *et al.*, 2004), sin embargo, otras especies que han sido poco estudiadas.

Como se ha mencionado, las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por ser una de las micofloras más abundantes en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005), y contribuyen significativamente en el control de organismos fitopatógenos pues poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas que se han estudiado ampliamente (Rojo *et al.*, 2007). Sin embargo, los estudios de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) por especies del género *Trichoderma* son muy escasos por lo que este trabajo se enfocó en evaluar la capacidad que tienen dos especies del género *Trichoderma* (una altamente tolerante y otra medianamente tolerante a la presencia de HPA) para biodegradar naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno en un medio mineral líquido.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Elección de un medio de cultivo líquido para las pruebas de degradación de hidrocarburos poliaromáticos

5.2.1.1. Medio mínimo sin fuente de carbono

En primera instancia se hizo crecer a las cepas fúngicas en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron de la suspensión por filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10^4 esporas mL⁻¹ (concentración inoculada a todos los medios probados).

Se utilizó un medio mínimo compuesto de (g L^{-1}) 0.1 CaCl_2 ; 0.2 KCl ; 0.5 KH_2PO_4 ; 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5. A frascos de vidrio de 150 mL de capacidad, se adicionaron 50 mL del medio mínimo. Previamente, se preparó una solución stock de naftaleno ($20,000 \text{ mg L}^{-1}$) disuelto en acetona, de esta solución se adicionaron 750 μL al medio de cultivo correspondiente para tener una concentración final de 300 mg de naftaleno L^{-1} de medio de cultivo. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la suspensión de esporas al medio, y se incubó a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a 150 rpm por seis días. Al finalizar el tiempo de incubación se evaluó la biomasa fresca y seca, y el contenido de proteína fúngica (Bradford, 1976; Anexo II). Se consideraron tres tratamientos, 1) el control que sólo contenía medio mínimo, 2) el medio mínimo con acetona (750 μL) para observar la influencia del disolvente utilizado en la preparación del stock del poliaromático sobre el crecimiento del hongo, y finalmente 3) el tratamiento con medio mínimo y naftaleno disuelto en acetona.

5.2.1.2. Medio mineral con o sin fuentes de carbono y diferentes disolventes

Para este experimento se utilizó el medio mineral compuesto de (g L^{-1}) 0.1 CaCl_2 ; 0.2 KCl ; 0.5 KH_2PO_4 ; 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.05 CuSO_4 ; 0.05 ZnSO_4 ; 0.43 MnSO_4 ; 0.05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$; pH 5.5. Además se probaron dos fuentes de carbono diferentes con este medio mineral: 0.83 ó 6 g L^{-1} de extracto de levadura y glucosa, respectivamente. Las unidades de crecimiento fueron preparadas con 50 mL de cada medio de cultivo en frascos de vidrio de 150 mL de capacidad. Previamente se prepararon dos soluciones stock de naftaleno a $20,000 \text{ mg L}^{-1}$, una disuelta en acetona y otra disuelta en diclorometano (CH_2Cl_2). De cada una de estas soluciones se adicionaron 750 μL al medio de cultivo correspondiente para tener una concentración final de 300 mg de

naftaleno L⁻¹ de medio de cultivo Posteriormente, se adicionó 1 mL de la suspensión de esporas al medio, y los tratamientos fueron incubados a 28 ± 2 °C a 150 rpm por seis días. Al término de la incubación se evaluó la biomasa fresca y seca, y el contenido de proteína fúngica (Bradford, 1976; Anexo II).

5.2.2. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Inoculación con esporas y con micelio fúngico

5.2.2.1. Preparación del inóculo

Las cepas fúngicas CP1 (*T. virens*) y CP4 (*T. viride*) se crecieron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron mediante filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10⁶ esporas mL⁻¹.

5.2.2.2. Condiciones del cultivo

A frascos de vidrio de 150 mL de capacidad, se adicionaron 50 mL del medio mineral (g L⁻¹) 0.1 CaCl₂; 0.2 KCl; 0.5 KH₂PO₄; 0.5 (NH₄)₂SO₄; 0.2 MgSO₄·7H₂O; 0.05 CuSO₄; 0.05 ZnSO₄; 0.43 MnSO₄; 0.05 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O; 6 glucosa, pH 5.5. Previamente, se preparó una solución stock de fenantreno (20,000 mg L⁻¹) disuelto en CH₂Cl₂. De esta solución se adicionaron 250 µL al medio de cultivo correspondiente para tener una concentración final de fenantreno de 100 mg L⁻¹. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la suspensión de esporas de cada una de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas (10⁶ esporas mL⁻¹) para aquél tratamiento con esporas. Además, se consideró un segundo

tratamiento inoculado únicamente con dos discos individuales de PDA con micelio del hongo (7 mm de diámetro). Posteriormente, ambos tratamientos se incubaron a 28 ± 2 °C a 150 rpm por seis días. Se hicieron tres muestreos cada 48 h para determinar la biomasa fresca y seca, y el contenido de proteína fúngica (Bradford, 1976; Anexo II), además del pH del medio de cultivo.

5.2.3. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Selección de una concentración apropiada de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno

5.2.3.1. Preparación del inóculo

Las cepas fúngicas CP1 (*T. virens*) y CP4 (*T. viride*) se crecieron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron de la suspensión por filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10^6 esporas mL^{-1} .

5.2.3.2. Condiciones del cultivo

A frascos de vidrio de 150 mL de capacidad, se adicionaron 50 mL del medio mineral (g L^{-1}) 0.1 CaCl_2 ; 0.2 KCl ; 0.5 KH_2PO_4 ; 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.05 CuSO_4 ; 0.05 ZnSO_4 ; 0.43 MnSO_4 ; 0.05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$; 6 glucosa, pH 5.5. Previamente se prepararon por separado, soluciones stock de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno ($20,000 \text{ mg L}^{-1}$) disueltas en CH_2Cl_2 . De cada una de estas soluciones se tomaron 125, 250 y 375 μL , respectivamente, y se adicionaron a los medios de cultivo

correspondientes, para tener una concentración final de 50, 100 y 150 mg L⁻¹ de cada uno de los hidrocarburos poliaromáticos. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la suspensión de esporas (10⁶ esporas mL⁻¹) de las dos cepas de *Trichoderma* seleccionadas, al medio de cultivo correspondiente. Los tratamientos fueron incubados a 28 ± 2 °C a 150 rpm por seis días. Al término de la incubación se evaluó la biomasa fresca y seca, y el contenido de proteína fúngica (Bradford, 1976; Anexo II) y el pH del medio de cultivo.

5.2.4. Biodegradación de compuestos poliaromáticos por dos cepas de *Trichoderma*

5.2.4.1. Preparación del inóculo

Las cepas CP1 (*T. virens*) y CP4 (*T. viride*) se crecieron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas de cada cepa, a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron de la suspensión por filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10⁶ esporas mL⁻¹.

5.2.4.2. Condiciones del cultivo

A frascos de vidrio de 150 mL de capacidad, se adicionaron 50 mL del medio mineral (g L⁻¹) 0.1 CaCl₂; 0.2 KCl; 0.5 KH₂PO₄; 0.5 (NH₄)₂SO₄; 0.2 MgSO₄.7H₂O; 0.05 CuSO₄; 0.05 ZnSO₄; 0.43 MnSO₄; 0.05 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.H₂O; 6 glucosa, pH 5.5. Previamente, se prepararon soluciones stock de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno a (20,000 mg L⁻¹) disueltas en CH₂Cl₂. De cada una de estas soluciones se tomaron 250 µL, y se adicionaron a los medios de cultivo correspondientes, para tener una concentración final de 100 mg L⁻¹ de cada uno de los hidrocarburos poliaromáticos. Posteriormente, se

adicionó 1 mL de la suspensión de esporas (10^6 esporas mL^{-1}) de las dos cepas de *Trichoderma*, al medio de cultivo correspondiente.

Los 6 tratamientos (factorial 2x3, dos cepas fúngicas y tres hidrocarburos poliaromáticos) fueron incubados a 28 ± 2 °C a 150 rpm por seis días. Al término de la incubación se evaluó la biomasa fresca y seca, y el contenido de proteína fúngica (Bradford, 1976; Anexo II), además del pH del medio de cultivo.

5.2.4.3. Determinación de la cinética de consumo de glucosa en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno

De las unidades experimentales utilizadas para la degradación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno se tomó una alícuota de 100 μL para la determinación de azúcares totales con el método de Dubois *et al.* (1956) (Anexo III). Las alícuotas se tomaron cada 24 h durante 11 días, en cada tratamiento.

5.2.4.4. Determinación de biomasa fúngica fresca, biomasa fúngica seca, proteínas fúngicas, consumo de glucosa, pH y porcentaje de degradación de los hidrocarburos poliarómicos

El micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración al vacío utilizando un equipo millipore. Después se hicieron tres lavados con 10 mL de hexano para extraer la fracción del hidrocarburo poliaromático correspondiente, que pudo haber quedado retenido en la membrana y en el micelio. El filtrado de estos lavados se concentró a 10 mL (Fracción 1). Al medio de cultivo de cada unidad experimental se le midió el pH, el consumo de glucosa (Dubois *et al.*, 1956; Anexo III) y se extrajo tres veces con hexano, para obtener al hidrocarburo poliaromático que pudiera haber quedado retenido en el medio de cultivo, luego se concentró a 10 mL (Fracción 2). Ambas fracciones fueron

reunidas, y secadas con Na₂SO₄ anhidro (adicionado a cada fracción hasta eliminar el contenido de agua), y se almacenadas en viales de vidrio a -20 °C.

Las fracciones fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies® Mod. 6890N) en una columna DB-5, (5%-fenil-metilpolisiloxano) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 70 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 °C durante 10 min usando una rampa de calentamiento de 40°C/min. El gas acarreador fue helio con un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue de 250 °C, y la inyección fue splitless. Una vez obtenido el cromatograma (Anexo IV), la identificación de cada uno de los picos cromatográficos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un detector de masas (Agilent Technologies® Mod. 5975 inert XL). Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, y para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral Search Program, versión 2.0d).

La biomasa fúngica obtenida después de filtrar cada tratamiento se pesó y después se tomó una fracción de 0.025 g para la determinación de la proteína fúngica por el método de Bradford (Anexo II). La fracción restante se seco en estufa a 40 ± 2 °C por 72 h para determinar el peso seco y posteriormente, se hizo una digestión alcalina que consistió en poner el micelio seco en un vaso de precipitados de 50 mL, adicionado con 10 mL de NaOH 5 N y se dejó por reposar por cinco días (Verdin *et al.*, 2005b). Luego el residuo fue extraído tres veces con 10 mL de hexano (Fracción 3), esta fracción fue secada con Na₂SO₄ anhidro y después se almacenó en un vial de vidrio a -20 °C para

determinar la cantidad del hidrocarburo poliaromático correspondiente, retenido en el micelio.

5.2.4.5. Determinación de parámetros cinéticos

Con los datos obtenidos de los experimentos anteriores se cálculo el rendimiento en biomasa, es decir, la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido (usualmente fuente de carbono). La ecuación matemática que representa el rendimiento en biomasa es la siguiente:

$$Y_{X/S} = - \left(\frac{dx}{ds} \right) \quad (1)$$

En donde x y s representan la concentración de biomasa y sustrato respectivamente y d indica la diferencial de dichos parámetros.

En la práctica, para el cálculo del rendimiento se emplea la expresión:

$$Y_{X/S} = - \left(\frac{\Delta X}{\Delta S} \right) \quad (2)$$

La velocidad de crecimiento se cálculo considerando que el crecimiento de los hongos filamentosos no es exponencial, de acuerdo con la ecuación de Koch:

$$W^{1/3} = W_0^{1/3} + Kt \quad (3)$$

En donde W y W_0 representan la concentración de biomasa en el tiempo de evaluación y el tiempo cero respectivamente, mientras que k representa la velocidad de crecimiento y t representa el tiempo de evaluación.

5.2.4.6. Análisis estadístico

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, empleando un factorial 2x3 (dos cepas fúngicas y tres hidrocarburos poliaromáticos). Los 6 tratamientos tuvieron tres repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de

varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) con el programa estadístico SAS.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Elección de un medio de cultivo líquido para las pruebas de degradación de hidrocarburos poliaromáticos.

5.3.1.1. Medio mínimo sin fuente de carbono

El medio mínim (Mi), o el medio mínimo con acetona (MiA) y el medio mínimo con naftaleno (MiAN) utilizados con la cepa fúngica CP1 (*T. virens*) no tuvieron los nutrimentos necesarios para que este hongo se pudiera desarrollar adecuadamente (**Fig. 5.1**), ya que las variables de crecimiento evaluadas tuvieron valores cercanos a cero.

5.3.1.2. Medio mineral con o sin fuentes de carbono y diferentes disolventes

El medio mineral incrementó significativamente ($P\leq 0.001$) la biomasa fúngica fresca, la biomasa fúngica seca y las proteínas fúngicas de la cepa fúngica CP1 (*Trichoderma virens*) y por lo tanto el medio mineral tuvo más nutrimentos necesarios para el desarrollo de este hongo en comparación con el medio mínimo (**Fig. 5.1**).

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ($P\leq 0.001$) entre las dos fuentes de carbono utilizadas y el medio mineral sin fuente de carbono para las tres variables evaluadas. Los tratamientos con glucosa incrementaron significativamente ($P\leq 0.001$) la biomasa fúngica fresca, la biomasa fúngica seca y las proteínas fúngicas de *T. virens*; es decir que, los tratamientos con glucosa fueron mejores que los tratamientos con extracto de levadura y los tratamientos sin fuente de carbono.

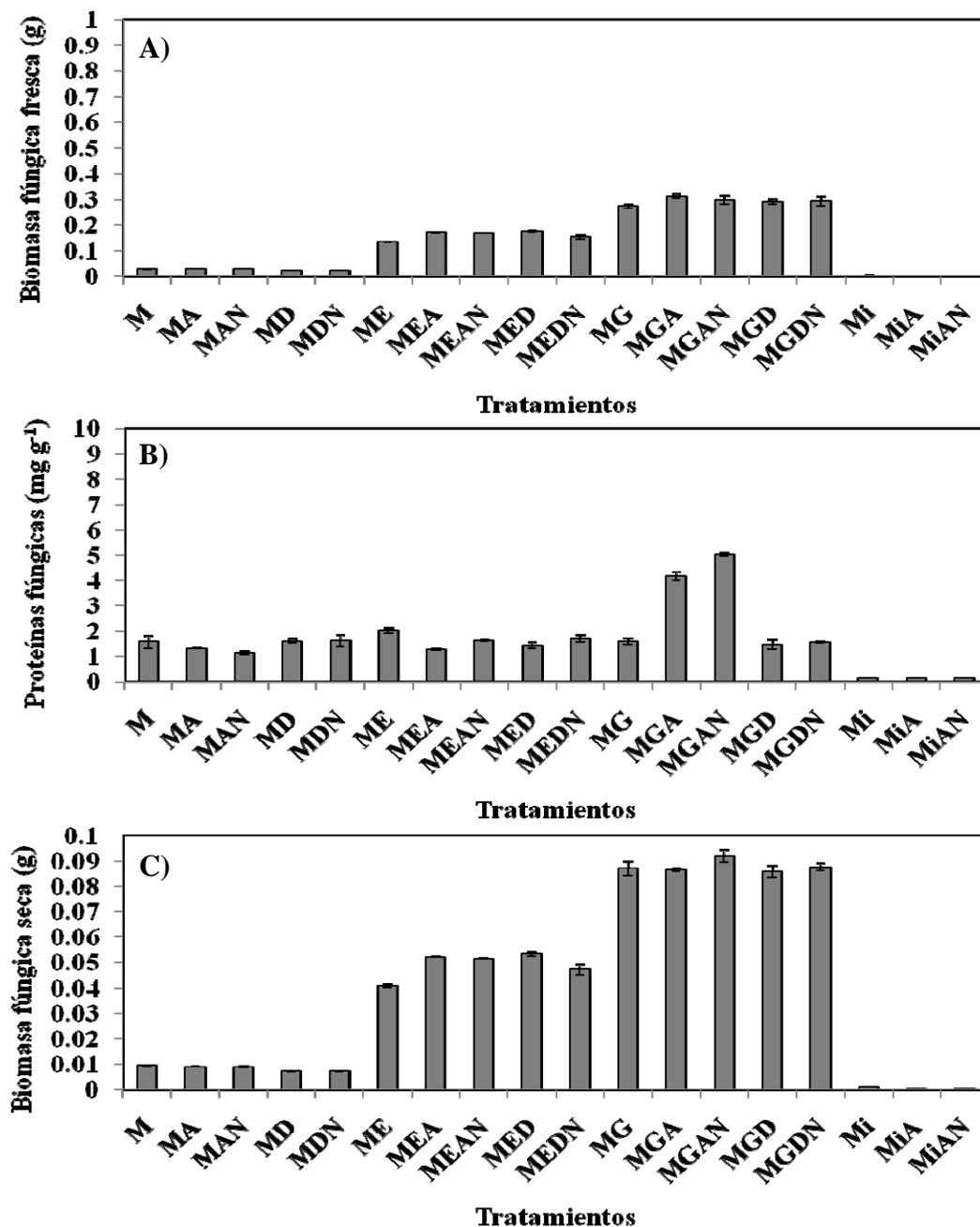


Figura 5.1. A) biomasa fúngica fresca, B) biomasa fúngica seca y C) proteínas fúngicas de *Trichoderma virens*, producida en medio mínimo, medio mineral sin fuente de carbono, medio mineral con extracto de levadura, y medio mineral con glucosa, a los seis días de la inoculación (n=3, Medias \pm error estándar). Simbología: Medio mínimo (Mi), medio mínimo con acetona (MiA), medio mínimo con acetona y naftaleno (MiAN), medio mineral (M), medio mineral con acetona (MA), medio mineral con acetona y naftaleno (MAN), medio mineral con diclorometano (MD), medio mineral con diclorometano y naftaleno (MDN), medio mineral con extracto de levadura (ME), medio mineral con extracto de levadura y acetona (MEA), medio mineral con extracto de levadura, acetona y naftaleno (MEAN), medio mineral con extracto de levadura y diclorometano (MED), medio mineral con extracto de levadura, diclorometano y naftaleno (MEDN), medio mineral con glucosa (MG), medio mineral con glucosa y acetona (MGA), medio mineral con glucosa, acetona y naftaleno (MGAN), medio mineral con glucosa y diclorometano (MGD) y medio mineral con glucosa, diclorometano y naftaleno (MGDN).

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre cada uno de los tratamientos, por lo que los mejores tratamientos que estimularon la biomasa fúngica fresca fueron el medio mineral-glucosa-acetona-sin naftaleno (MGA), el medio mineral-glucosa-acetona-naftaleno (MGAN), el medio mineral-glucosa-diclorometano-naftaleno (MGDN), y el medio mineral-glucosa-diclorometano-sin naftaleno (MGD). Para proteína fúngica, el mejor tratamiento fue MGA, mientras que para la biomasa fúngica seca los mejores tratamientos fueron MGAN, MGDN, MG, MGA y MGD. Es evidente que los mejores tratamientos fueron aquellos en los que se aplicó glucosa como fuente de carbono.

5.3.2. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Inoculación con esporas y con micelio fúngico

5.3.2.1. Biomasa fúngica seca

Analizando la biomasa fúngica se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48 h, *T. virens* presentó mayor biomasa fúngica seca que *T. viride*, aunque a las 96 h, la cepa CP4 (*T. viride*) tuvo mayor incremento en su biomasa fúngica seca. En contraste, a las 144 h no se observaron diferencias entre la biomasa fúngica seca de *T. virens* y *T. viride*. La forma de inoculación no tuvo efecto en la biomasa fúngica seca, pues no se observaron diferencias estadísticas, al inocular con esporas o con micelio.

A las 48 y 96 h los controles presentaron un incremento significativo ($P \leq 0.001$) en su biomasa fúngica seca en comparación con los tratamientos expuestos a fenantreno; aunque estas diferencias significativas se perdieron a las 144 h. A las 48 h, el control

inoculado con esporas de *T. virens* y el control inoculado con esporas de *T. viride* incrementaron considerablemente su biomasa fúngica seca. No obstante, a las 96 h el tratamiento inoculado con micelio de *T. viride* expuesto a fenantreno, el control inoculado con esporas de *T. viride* y el control inoculado con micelio de *T. viride* incrementaron su biomasa fúngica seca en comparación con los otros tratamientos (**Fig. 5.2**). Finalmente a las 144 h, los tratamientos inoculados con esporas o con micelio de *T. viride* expuesto a fenantreno, y el control inoculado con micelio de *T. virens* presentaron mayor biomasa fúngica seca en comparación con el resto de los tratamientos (**Fig. 5.2**).

5.3.2.2. Biomasa fúngica fresca

En la biomasa fúngica fresca se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas ensayadas. A las 48 h, *T. virens* presentó mayor biomasa fúngica fresca que *T. viride*, pero a las 96 y 144 h, *T. viride* tuvo mayor biomasa fúngica fresca. La forma de inoculación no tuvo efecto en la biomasa fúngica fresca, pues no se observaron diferencias estadísticas al inocular esporas o micelio fúngico. A las 48 y 96 h los controles presentaron significativamente mayor ($P \leq 0.001$) biomasa fúngica fresca en comparación con los tratamientos expuestos a fenantreno (**Fig. 5.3**). A las 144 h, no se observaron diferencias significativas en la biomasa fúngica fresca de los controles y de los tratamientos expuestos a fenantreno (**Fig. 5.3**).

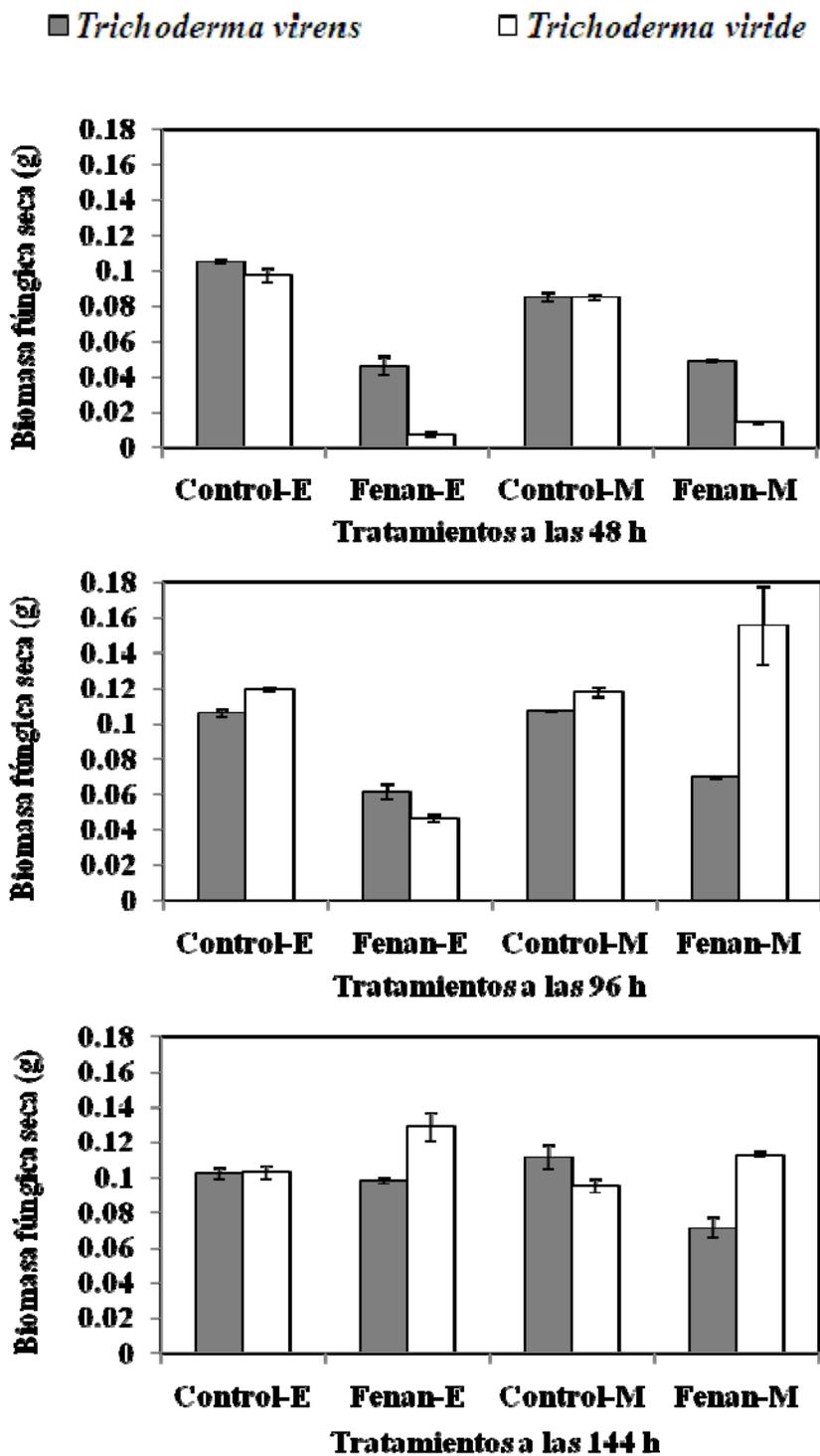


Figura 5.2. Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre la biomasa fúngica seca, en un medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L^{-1}). Se evaluó cada 48 h ($n=3$, Media \pm error estándar). Control inoculado con esporas fúngicas (Control-E), control inoculado con micelio fúngico (Control-M), tratamiento inoculado con esporas fúngicas contaminado con fenantreno (Fenan-E) y tratamiento inoculado con micelio fúngico contaminado con fenantreno (Fenan-M).

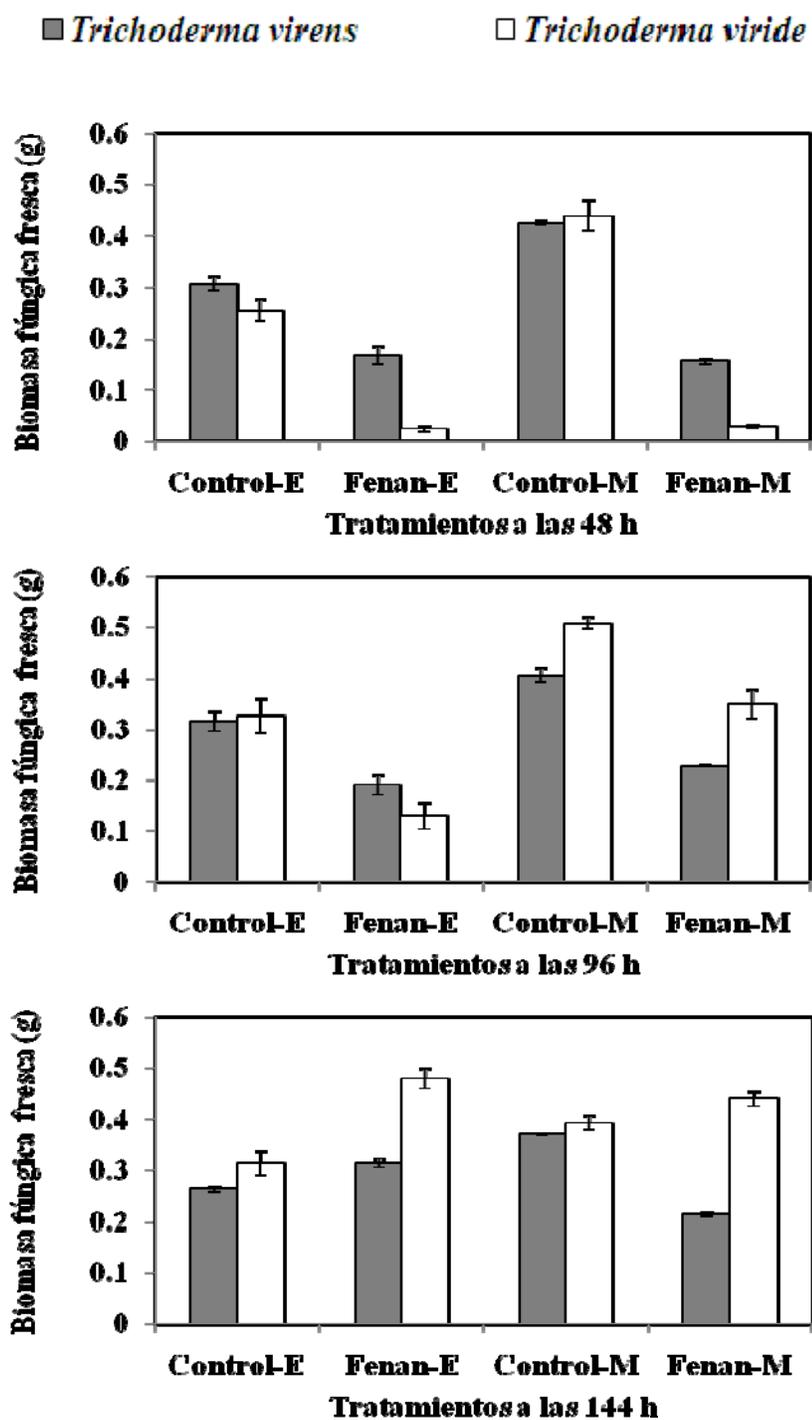


Figura 5.3. Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre la biomasa fúngica fresca, en un medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L^{-1}). Se evaluó cada 48 h ($n=3$, Media \pm error estándar). Control inoculado con esporas fúngicas (Control-E), control inoculado con micelio fúngico (Control-M), tratamiento inoculado con esporas fúngicas contaminado con fenantreno (Fenan-E) y tratamiento inoculado con micelio fúngico contaminado con fenantreno (Fenan-M).

5.3.2.3. Contenido de proteína fúngica

En el contenido de proteína fúngica se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48 y 96 h, *T. viride* presentó mayor proteína fúngica que *T. virens*; mientras que a las 144 h, *T. virens* tuvo mayor contenido de proteína fúngica. La forma de inoculación no tuvo efecto en la concentración de proteínas fúngicas, pues no se observaron diferencias estadísticas al inocular esporas o micelio fúngico. A las 48 h, los tratamientos expuestos a fenantreno tuvieron incrementos significativos ($P \leq 0.001$) en el contenido de proteína fúngica en comparación con los controles. En contraste, a las 96 y 144 h no se tuvieron diferencias significativas en el contenido de proteína fúngica entre el control y los tratamientos expuestos a fenantreno. A las 48 h, los tratamientos inoculados con esporas o micelio de *T. viride* expuestos a fenantreno, el tratamiento inoculado con micelio de *T. virens* expuesto a fenantreno, y el control inoculado con esporas de *T. viride* presentaron mayor contenido de proteína fúngica (**Fig 5.4**), aunque a las 96 y 144 h, el control inoculado con esporas de *T. viride* presentó mayor contenido de proteína fúngica en comparación con el resto de los tratamientos.

5.3.2.4. Efecto del pH

Analizando el pH de los tratamientos, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48 h, *T. virens* produjo mayor disminución del pH del medio de cultivo en comparación con *T. viride*, mientras que a las 96 y 144 h no se observaron diferencias en el pH en los tratamientos inoculados con *T. virens* y *T. viride* (**Fig. 5.5**).

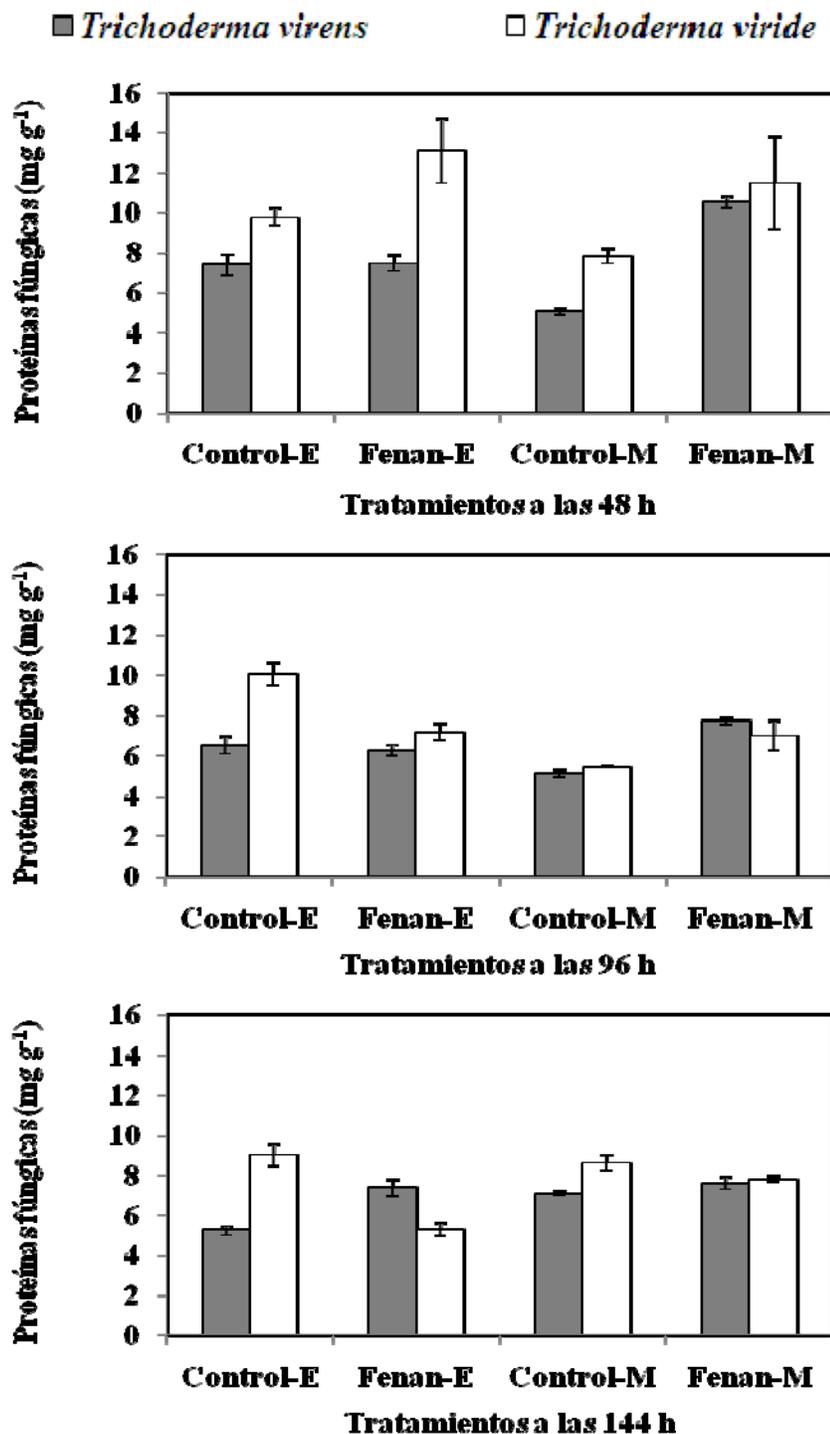


Figura 5.4. Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre las proteínas fúngicas, en un medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L^{-1}). Se evaluó cada 48 h ($n=3$, Media \pm error estándar). Control inoculado con esporas fúngicas (Control-E), control inoculado con micelio fúngico (Control-M), tratamiento inoculado con esporas fúngicas contaminado con fenantreno (Fenan-E) y tratamiento inoculado con micelio fúngico contaminado con fenantreno (Fenan-M).

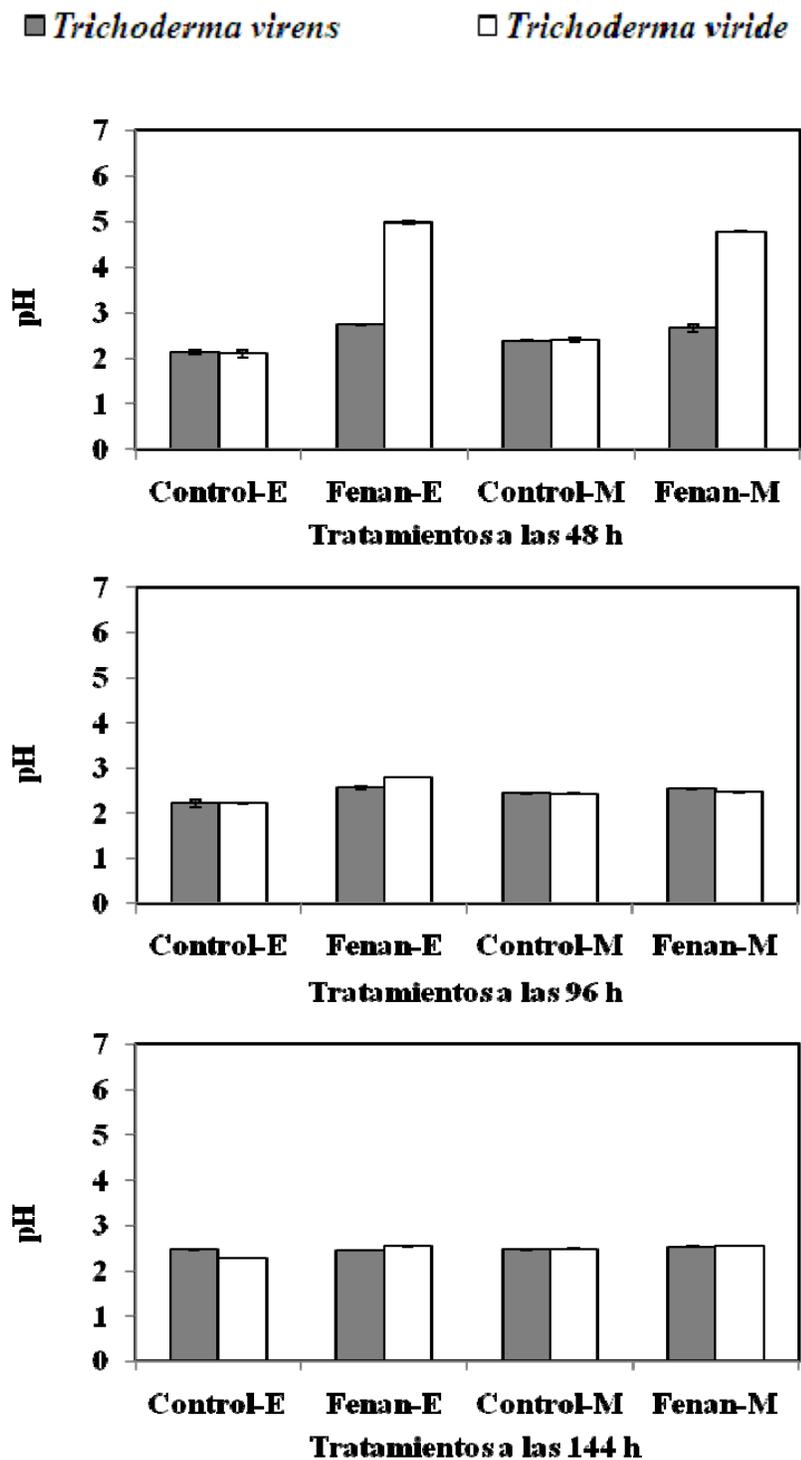


Figura 5.5. Efecto de la inoculación (esporas o micelio) sobre el pH del medio de cultivo líquido contaminado con fenantreno (100 mg L^{-1}). Se evaluó cada 48 h ($n=3$, Media \pm error estándar). Control inoculado con esporas fúngicas (Control-E), control inoculado con micelio fúngico (Control-M), tratamiento inoculado con esporas fúngicas contaminado con fenantreno (Fenan-E) y tratamiento inoculado con micelio fúngico contaminado con fenantreno (Fenan-M).

La forma de inoculación no tuvo efecto en el pH, pues no se observaron diferencias estadísticas al inocular con esporas o con micelio fúngico. Es claro que los tratamientos sin la presencia del contaminante (controles) disminuyeron de manera más rápida el pH en comparación con aquellos tratamientos expuestos al fenantreno. A las 48 y 96, h el control inoculado con esporas de *T. viride* y el control inoculado con esporas de *T. virens* disminuyeron considerablemente su pH. En contraste, a las 144 h el control inoculado con esporas de *T. viride* tuvo menor pH en comparación con los demás tratamientos.

5.3.3. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Selección de una concentración apropiada de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno.

Los tratamientos expuestos a naftaleno incrementaron la biomasa fúngica fresca de *T. viride* en comparación con *T. virens*, pero no se observaron diferencias estadísticas con respecto a la biomasa fúngica seca, pH y las proteínas fúngicas entre ambas especies. Las tres dosis empleadas de naftaleno no produjeron diferencias significativas en la biomasa fúngica fresca y seca, con respecto al control (**Fig. 5.6 y Fig. 5.7**). Sin embargo, en los controles y en la dosis de 50 mg L⁻¹ se observó un incremento significativo ($P \leq 0.001$) en la concentración de proteínas fúngicas (**Fig. 5.8**). Es importante mencionar que los controles inoculados con *T. virens* y *T. viride* respectivamente, disminuyeron el pH (2.7-2.9) del medio de cultivo.

Con respecto a los tratamientos, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en la biomasa fúngica fresca y la concentración de proteína fúngica.

Trichoderma viride expuesta a 150 mg L⁻¹ de naftaleno y su correspondiente control incrementaron su biomasa fúngica fresca. A su vez, *T. virens* expuesta a 50 y 100 mg L⁻¹ de naftaleno, *T. viride* expuesta a 50 y 100 mg L⁻¹ de naftaleno y sus correspondientes controles presentaron mayor concentración de proteína fúngica, en comparación con los tratamientos restantes (**Fig. 5.8**). En el caso de la biomasa seca, todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales. El control de *T. viride* disminuyó significativamente el pH del medio de cultivo (2.3) en comparación con los otros tratamientos (**Fig. 5.9**).

En el caso de fenantreno, *T. viride* incrementó significativamente ($P \leq 0.001$) su biomasa fúngica fresca y seca en comparación con *T. virens*, en todas las dosis de este hidrocarburo poliaromático. Además, *T. viride* produjo mayor disminución del pH en los medios contaminados con fenantreno en comparación con *T. virens*, aunque este último hongo tuvo significativamente ($P \leq 0.001$) mayor concentración de proteína fúngica. Las tres dosis utilizadas de fenantreno produjeron el mismo efecto en la biomasa fúngica fresca, la biomasa fúngica seca y la concentración de proteína fúngica en comparación con los controles en las dos especies evaluadas. Los controles de los hongos sin presencia del contaminante, produjeron mayor disminución del pH en comparación con los tratamientos expuestos a fenantreno (**Fig. 5.9**).

Con respecto a tratamientos, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en la biomasa fúngica fresca y seca, y en la concentración de proteína fúngica.

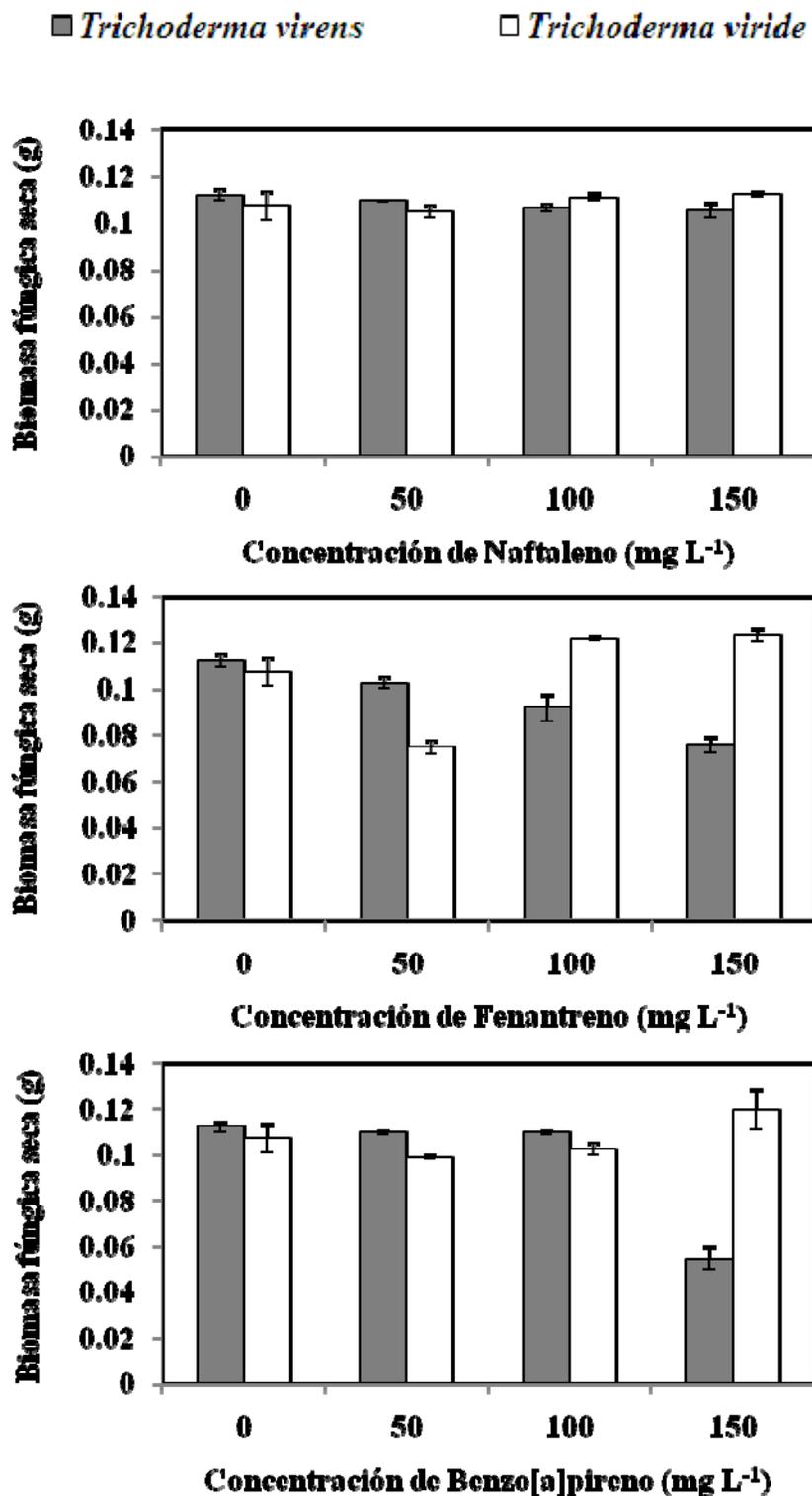


Figura 5.6. Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en la biomasa fúngica seca de *Trichoderma virens* y *T. viride*, a las 144 h (n=3, Media \pm error estándar).

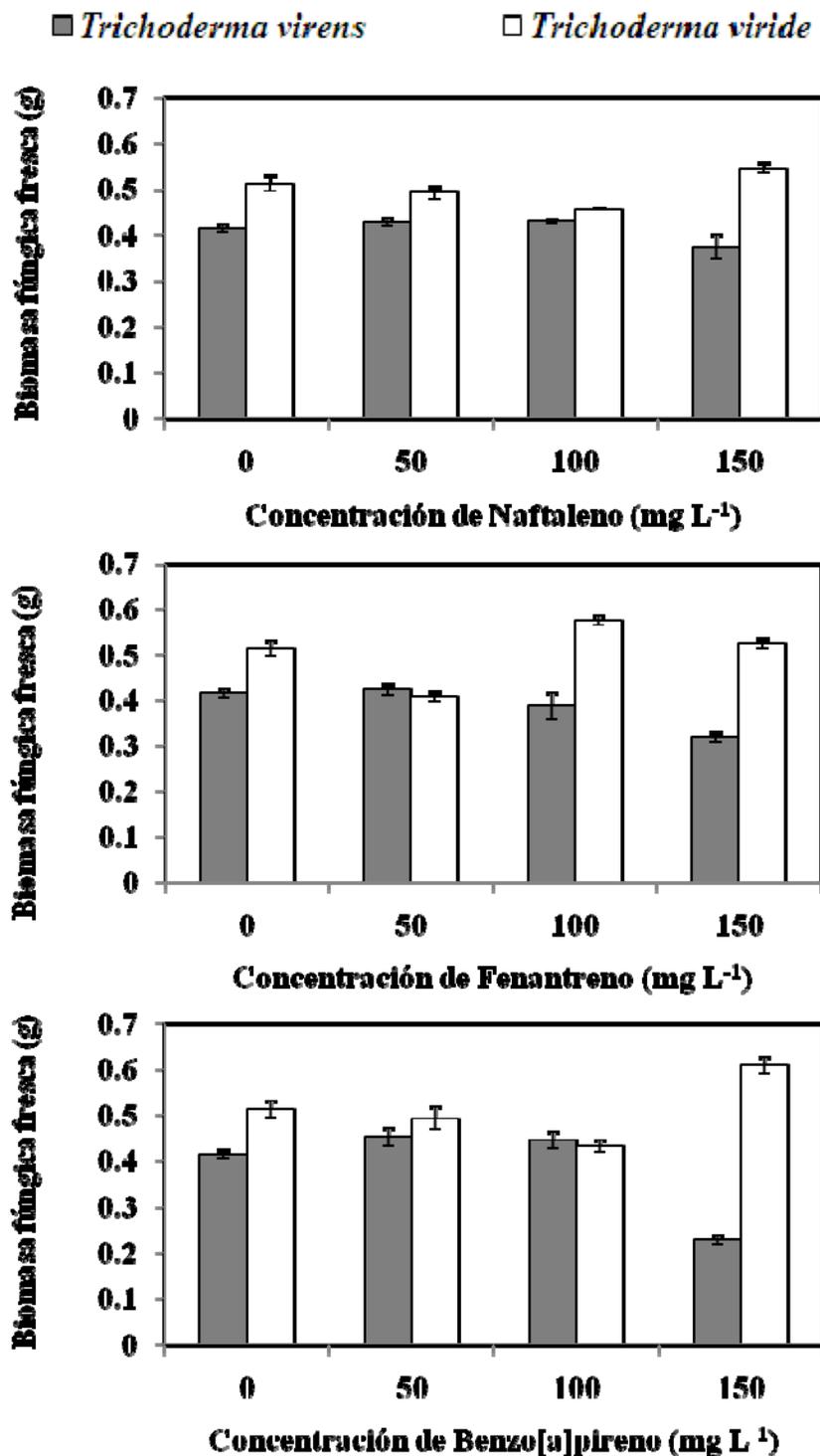


Figura 5.7. Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en la biomasa fúngica fresca de *Trichoderma virens* y *T. viride*, a las 144 h (n=3, Media ± error estándar).

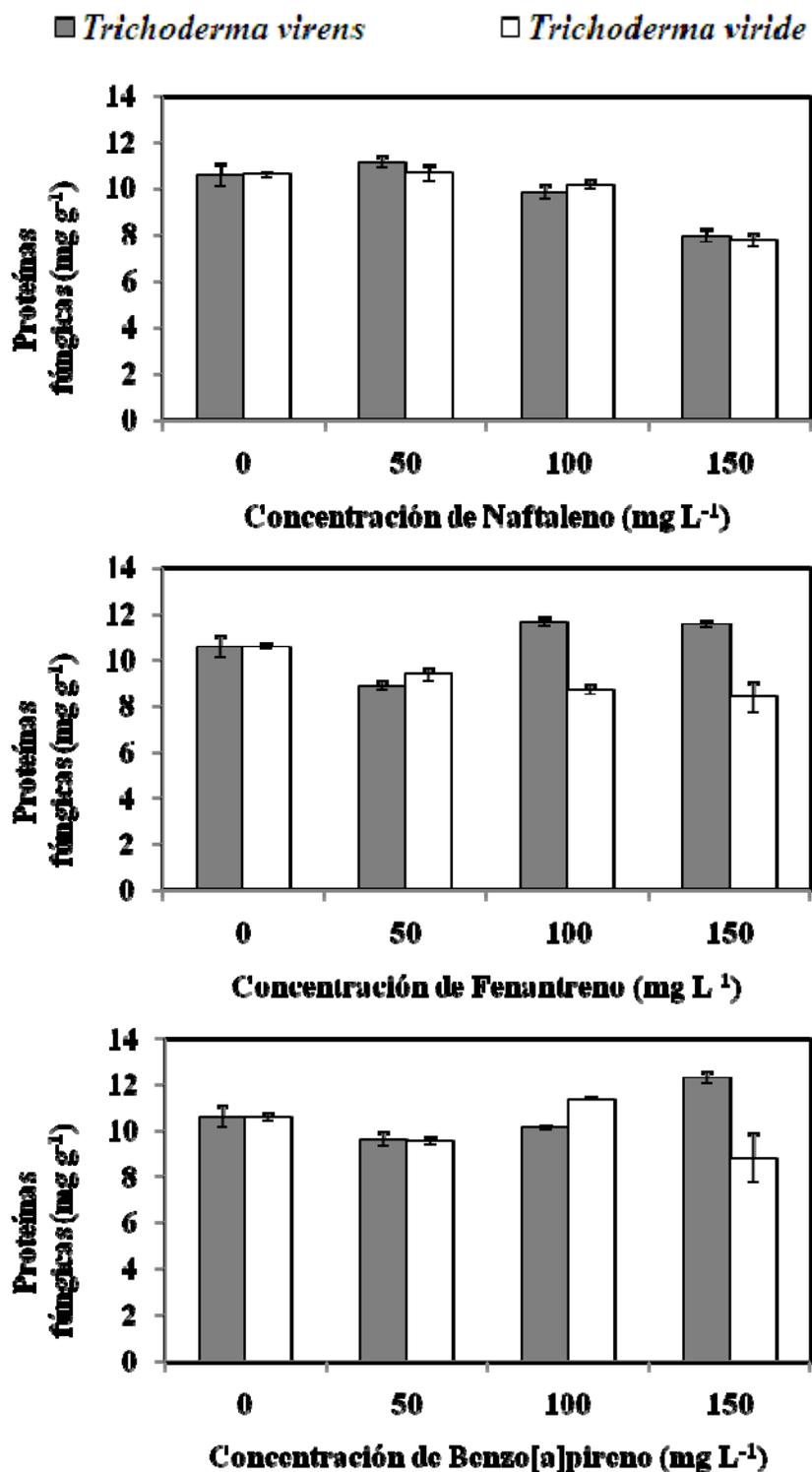


Figura 5.8. Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en la concentración de proteínas fúngicas de *Trichoderma virens* y *T. viride*, a las 144 h (n=3, Media \pm error estándar).

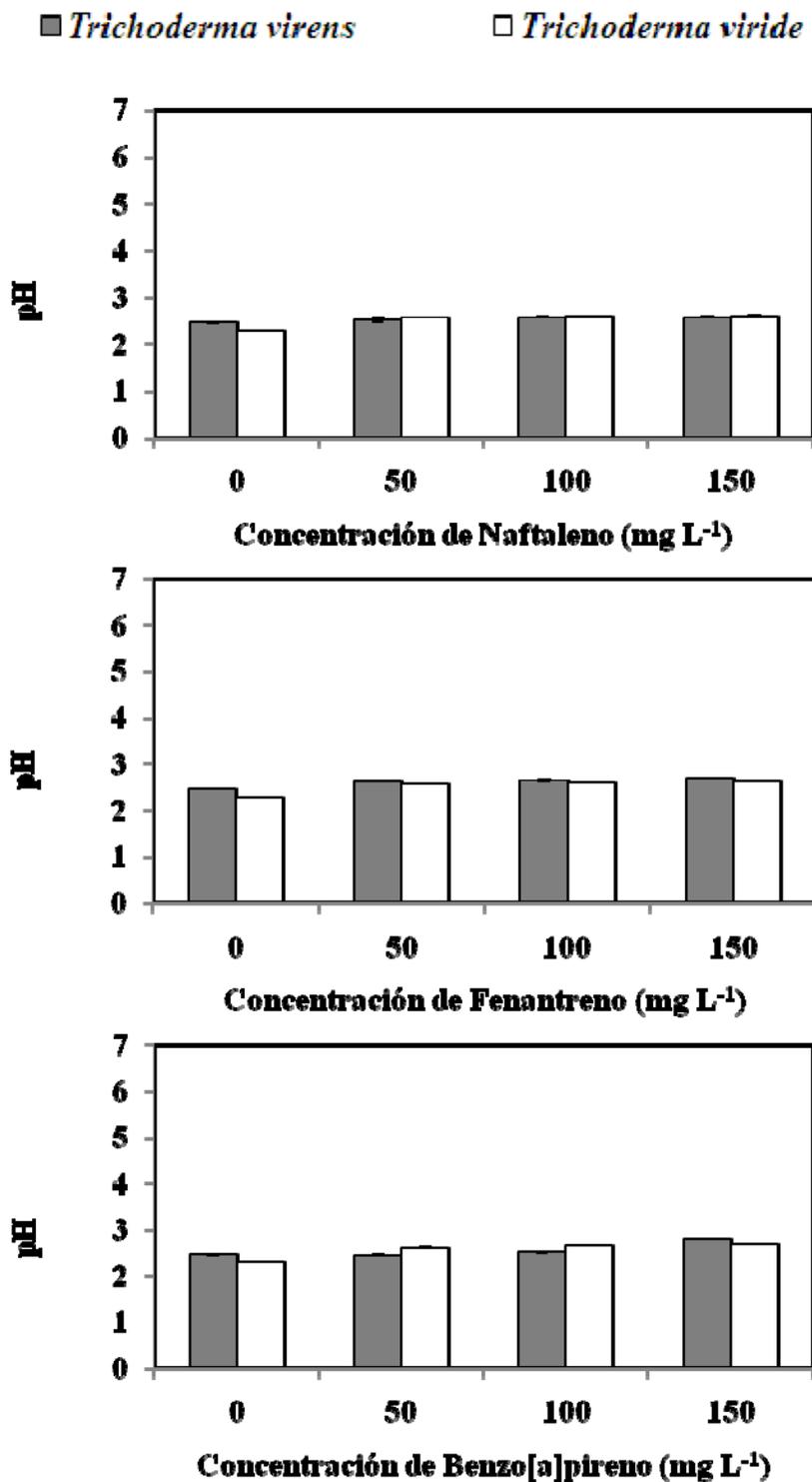


Figura 5.9. Efecto de diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en el pH del medio de cultivo inoculado con *Trichoderma virens* y *T. viride*, a las 144 h (n=3, Media ± error estándar).

Trichoderma viride expuesta a 100 y 150 mg L⁻¹ de fenantreno, y su correspondiente control presentaron mayor biomasa fúngica fresca y seca (**Fig. 5.6** y **Fig. 5.7**). *Trichoderma virens* expuesta a 100 y 150 mg L⁻¹ de fenantreno, y los controles de ambos hongos produjeron mayor concentración de proteína fúngica que los otros tratamientos (**Fig. 5.8**).

Para el caso de benzo[a]pireno, *T. viride* incrementó significativamente ($P \leq 0.001$) su biomasa fúngica fresca en comparación con *T. virens*, aunque en ambos hongos no se obtuvieron diferencias significativas en biomasa fúngica seca y la concentración de proteína fúngicas. No obstante, *T. viride* produjo mayor disminución del pH en comparación con *T. virens*. Las dosis de 50 y 100 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno utilizadas, no produjeron diferencias significativas en la biomasa fúngica fresca y seca, y en la concentración de proteína fúngica para ambos hongos. Sin embargo, la dosis de 150 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno disminuyó significativamente ($P \leq 0.001$) la biomasa fúngica fresca y seca de *T. virens* (**Fig. 5.6** y **Fig. 5.7**).

La biomasa fresca y la concentración de proteína fúngica de cada uno de los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$). El control de *T. viride*, *T. viride* expuesta a 50, 100 y 150 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno, y *T. virens* expuesta a 50 y 100 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno, presentaron incrementos en su biomasa fúngica fresca (**Fig. 5.7**). *Trichoderma virens* expuesta a 150 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno, *T. viride* expuesta a 100 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno, y sus correspondientes controles incrementaron su concentración de proteínas fúngicas en comparación con el resto de los tratamientos (**Fig. 5.8**). A excepción de *T. virens* expuesta a 150 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno, todos los tratamientos tuvieron incrementos similares en su biomasa fúngica seca (**Fig. 5.6**).

5.3.4. Biodegradación de compuestos poliaromáticos por dos cepas de *Trichoderma*

5.3.4.1. Cinética de consumo de glucosa en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno.

Las dos cepas de *Trichoderma* presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en el consumo de glucosa, en presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (**Fig. 5.10**). *Trichoderma virens* consumió más glucosa de las 24 a las 120 h, que *T. viride*. Sin embargo, *T. viride* tuvo mayor consumo de glucosa de las 144 a las 168 h, pero de las 198 h hasta el fin del experimento *T. virens* presentó el mayor consumo de glucosa.

El consumo de glucosa fue afectado significativamente ($P \leq 0.001$) por los hidrocarburos poliaromáticos. A las 24 h los controles tuvieron mayor consumo de glucosa, seguidos de los tratamientos con benzo[a]pireno, naftaleno y fenantreno, respectivamente. Mientras que a las 48, 72, 96, 120 y 144 h los controles tuvieron el mayor consumo de glucosa seguidos por los tratamientos con naftaleno, benzo[a]pireno y fenantreno. Sin embargo, a las 168, 192 y 216 h los tratamientos con naftaleno consumieron más glucosa que los otros tratamientos (**Fig. 5.10**). Finalmente, a las 240 h, el consumo de glucosa fue igual para los controles y los tratamientos expuestos a los tres contaminantes.

5.3.4.2. Determinación de biomasa fúngica fresca, biomasa fúngica seca, proteínas fúngicas, consumo de glucosa, pH y degradación de hidrocarburos poliarómicos.

Los datos obtenidos de biomasa fúngica fresca y seca, proteína fúngica y consumo de glucosa de los experimentos de degradación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno se encuentran resumidos en un cuadro (Anexo V).

■ Glucosa □ Control ▲ Naftaleno ● Fenantreno ○ Benzo[a]pireno

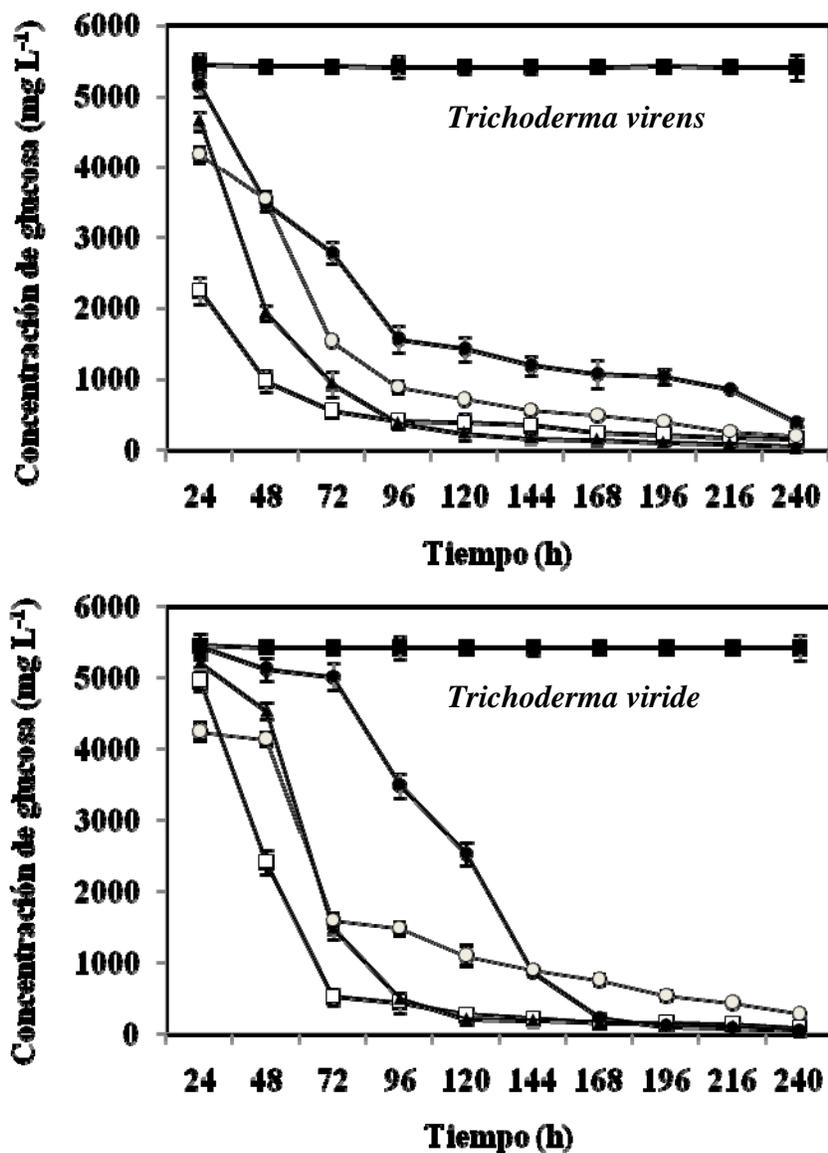


Figura 5.10. Consumo de glucosa por *T. virens* y *T. viride* al ser expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L^{-1}) en un medio líquido, evaluadas cada 24 h por once días ($n=3$, Media \pm error estándar).

5.3.4.2.1. Biomasa fúngica fresca

La biomasa fúngica fresca presentó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48 h, *T. virens* tuvo mayor biomasa fúngica fresca que *T.*

viride; aunque a las 96 h no se observaron diferencias entre ambos hongos. A las 144 h, *T. viride* presentó mayor biomasa fúngica fresca (**Fig. 5.11**).

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en la biomasa fúngica fresca de cada uno de los tratamientos. A las 48 h, el control de *T. virens*, *T. viride* en presencia de naftaleno, *T. virens* en presencia de benzo[*a*]pireno y *T. virens* en presencia de naftaleno incrementaron considerablemente su biomasa fúngica fresca (**Fig. 5.11**). A las 96 h, *T. viride* en presencia de benzo[*a*]pireno y naftaleno, el control de *T. viride*, *T. virens* en presencia de naftaleno y benzo[*a*]pireno, y el control de *T. virens* presentaron mayor biomasa fúngica fresca que los demás tratamientos. Finalmente a las 144 h, *T. viride* ante fenantreno incrementó su biomasa fúngica fresca (**Fig. 5.11**).

5.3.4.2.2. Biomasa fúngica seca

La biomasa fúngica seca presentó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48 h *T. virens* presentó mayor biomasa seca que la cepa CP4 (*T. viride*); aunque a las 96 y 144 h, no se observaron diferencias en la biomasa fúngica seca de ambos hongos. A las 48 y 96 h, los controles presentaron significativamente ($P \leq 0.001$) mayor biomasa seca en comparación con los demás tratamientos. A las 144 h, todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales en su biomasa fúngica seca (**Fig. 5.11**).

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en la biomasa fúngica seca de cada uno de los tratamientos (**Fig. 5.11**). A las 48 h, el control de *T. virens* y el control de *T. viride* presentaron mayor biomasa fúngica seca. Pero a las 96 h, *T. virens* en presencia de naftaleno o en presencia de benzo[*a*]pireno, *T. viride* en presencia de naftaleno, y los correspondientes controles, incrementaron su biomasa fúngica seca en comparación con

los demás tratamientos. A las 144 h *T. viride* en presencia de fenantreno y *T. virens* en presencia de naftaleno fueron los tratamientos con mayor biomasa fúngica seca.

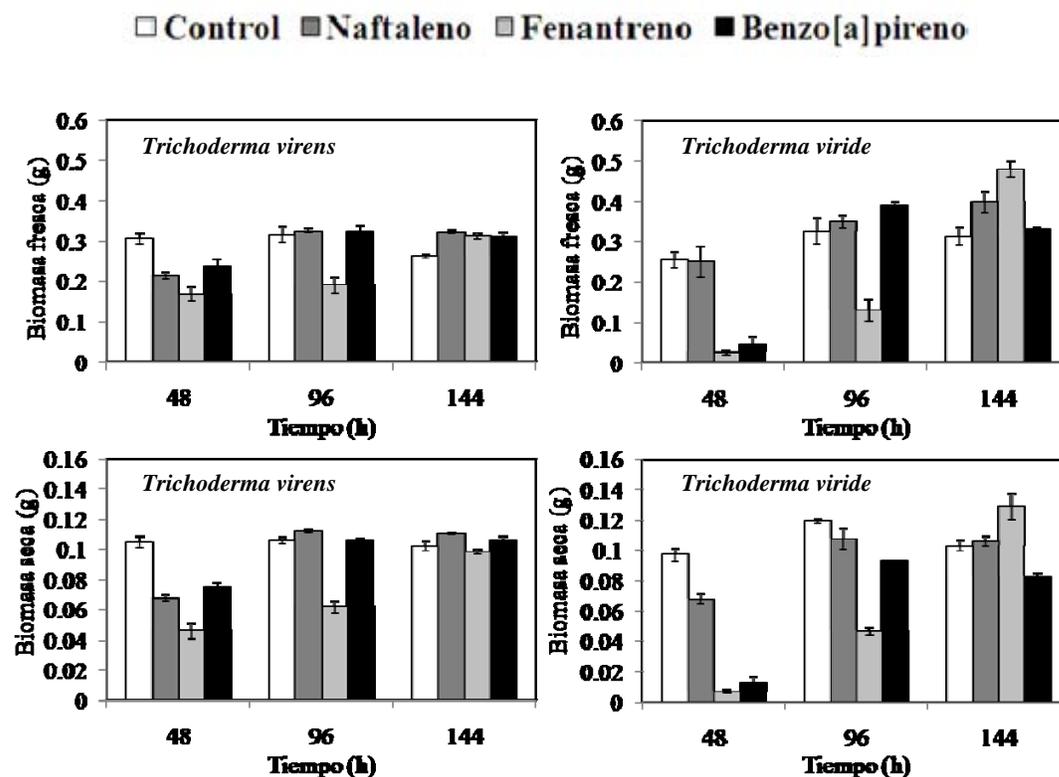


Figura 5.11. Biomasa fúngica fresca y seca de las cepas fúngicas expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L^{-1}) en un medio líquido, evaluadas cada 48 h por seis días ($n=3$, Media \pm error estándar).

5.3.4.2.3. Proteínas fúngicas

La concentración de proteína fúngica presentó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48, 96 y 144 h *T. viride* tuvo mayor concentración de proteína en comparación con *T. virens*, a las 48 h, los tratamientos en presencia de benzo[a]pireno tuvieron un incremento significativo ($P \leq 0.001$) en su concentración de proteína fúngica. A las 96 h los controles fúngicos produjeron mayor concentración de

proteína que los demás tratamientos, aunque a las 144 h la concentración de proteína fúngica fue igual en todos los tratamientos (**Fig. 5.12**).

En el caso de los tratamientos, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en la concentración de proteína fúngica. A las 48 h, *T. viride* en presencia de benzo[a]pireno o de fenantreno, y su correspondiente control, presentaron mayor concentración de proteína fúngica. En contraste, a las 96 h el control de la cepa CP4 (*T. viride*) tuvo mayor concentración de proteína fúngica. Finalmente, a las 144 h, el control de *T. viride*, *T. viride* en presencia de naftaleno o de benzo[a]pireno, y *T. virens* en presencia de fenantreno presentaron el mayor incremento en la concentración de proteínas.

5.3.4.2.4. Consumo de glucosa

El consumo de glucosa presentó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas. A las 48 h, *T. virens* tuvo mayor consumo de glucosa que *T. viride* en todos los tratamientos (**Fig. 5.12**). Sin embargo, *T. viride* comenzó a incrementar su consumo de glucosa en todos los tratamientos al transcurrir del tiempo.

5.3.4.2.5. Efecto del pH

Todos los medios de cultivo inicialmente tuvieron un pH promedio de 5.3, las cepas fúngicas probadas fueron incapaces de crecer en un rango de pH entre 5.3-4.9 (observaciones de experimentos preliminares). Sin embargo, las dos especies de *Trichoderma* fueron capaces de reducir el pH en un rango de 2.3-2.7, lo que indica la posible secreción de ácidos orgánicos para bajar el pH del medio de cultivo.

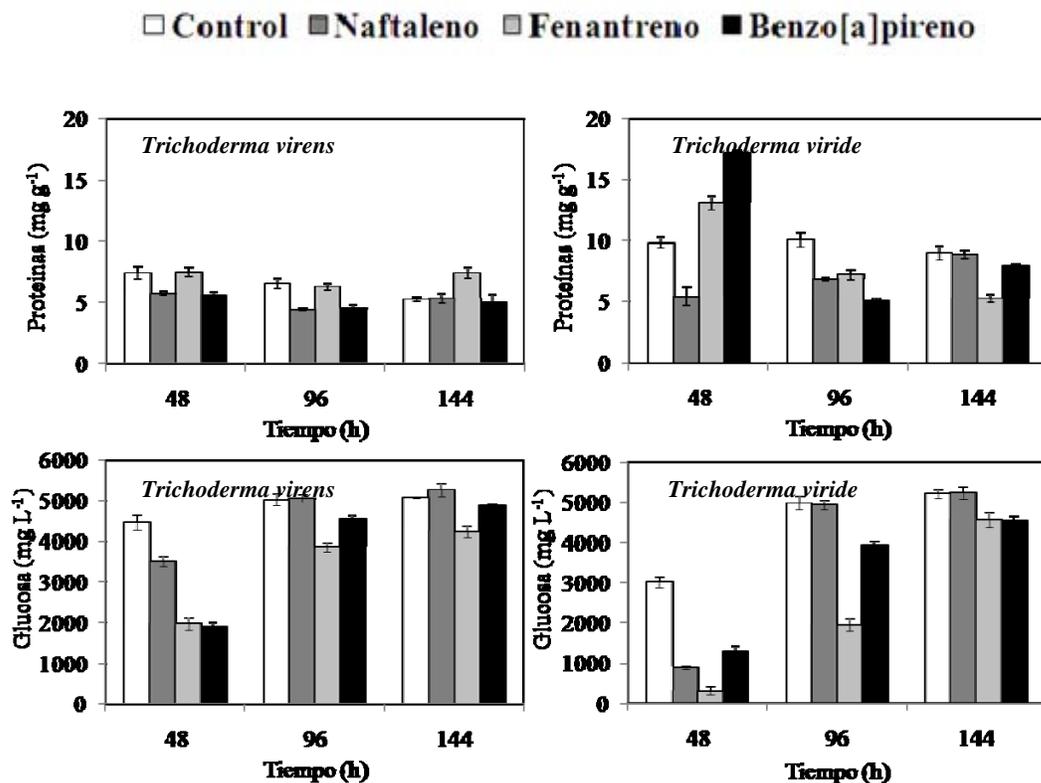


Figura 5.12. Proteína fúngica y consumo de glucosa de las cepas fúngicas expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L^{-1}) en un medio líquido, evaluadas cada 48 h por seis días ($n=3$, Media \pm error estándar).

Es importante mencionar que las cepas fúngicas probadas tardan mayor tiempo en bajar el pH del medio de cultivo en presencia de los hidrocarburos poliaromáticos. Además, se encontró una relación inversamente proporcional entre el crecimiento fúngico y el pH del medio; es decir, si el pH del medio de cultivo es alto el crecimiento fúngico será bajo (**Fig. 5.13**). El pH del medio presentó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas. A las 48 y 96 h, *T. virens* produjo mayor reducción del pH del medio de cultivo en comparación con *T. viride*, pero a las 144 h no se observaron diferencias en el pH de las dos cepas fúngicas. A las 48 h, los controles y los tratamientos expuestos a naftaleno disminuyeron significativamente ($P \leq 0.001$) el pH del medio de

cultivo en comparación con los demás tratamientos, y a las 96 y 144 h únicamente los controles disminuyeron considerablemente el pH del medio de cultivo.

■ pH inicial □ Control ■ Naftaleno □ Fenantreno ■ Benzo[a]pireno

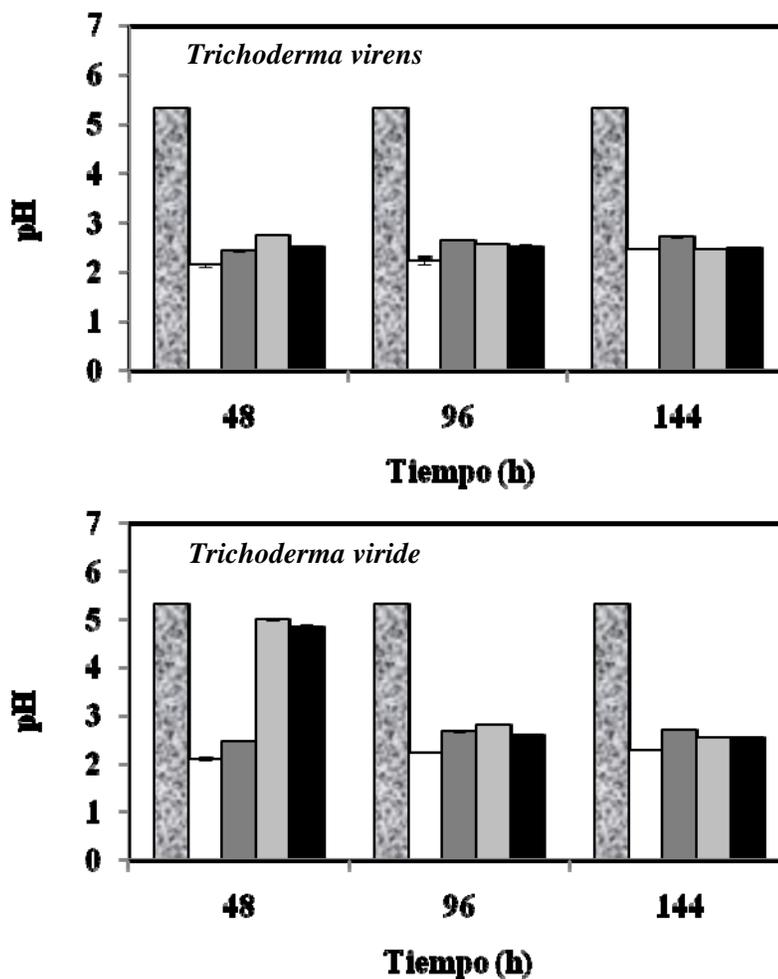


Figura 5.13. Comportamiento del pH de los medios de cultivo de crecimiento de dos cepas fúngicas expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (100 mg L^{-1}), evaluadas cada 48 h por seis días ($n=3$, Media \pm error estándar).

5.3.4.2.6. Degradación de hidrocarburos poliaromáticos

El análisis químico de las extracciones de los controles abióticos (sin hongo), empleando GC-MS, indicó que hubo una reducción en la concentración de los hidrocarburos poliaromáticos que inicialmente se tenían en los tratamientos contaminados. Esta reducción se debió a factores externos que no están relacionados con la degradación observada con las cepas de *Trichoderma*. En el naftaleno se observa una pérdida del 97%, para el fenantreno la pérdida fue cercana al 50%, y el benzo[*a*]pireno tuvo una pérdida mucho menor (20%), lo cual nos confirma su gran estabilidad química (**Fig. 5.14**). Los cálculos de degradación para las cepas fúngicas de *Trichoderma* toman en consideración esta pérdida debida a factores externos. En la Figura **5.15** se observa la disminución en la concentración de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno obtenida por las cepas de *Trichoderma* con respecto a la concentración del control abiótico encontrada por los análisis químicos ya mencionados.

5.3.4.2.6.1. Degradación y acumulación de naftaleno

La degradación de naftaleno tuvo diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas utilizadas, a las 48 y 96 h *T. viride* contribuyó con mayor degradación de naftaleno (>50%) que *T. virens*, pero a las 144 h, *T. virens* tuvo mayor degradación (**Fig. 5.16**). A pesar de haber encontrado muchas variaciones en los resultados de degradación, los datos de acumulación no presentan la misma variación por lo que se tiene que el micelio fúngico de *T. virens* y de *T. viride* tuvieron similar acumulación de naftaleno en sus tejido, a las 48 y 144 h (**Fig 5.17**). A las 96 h, el micelio de *T. viride* acumuló mayor naftaleno en comparación con el micelio de *T. virens*.

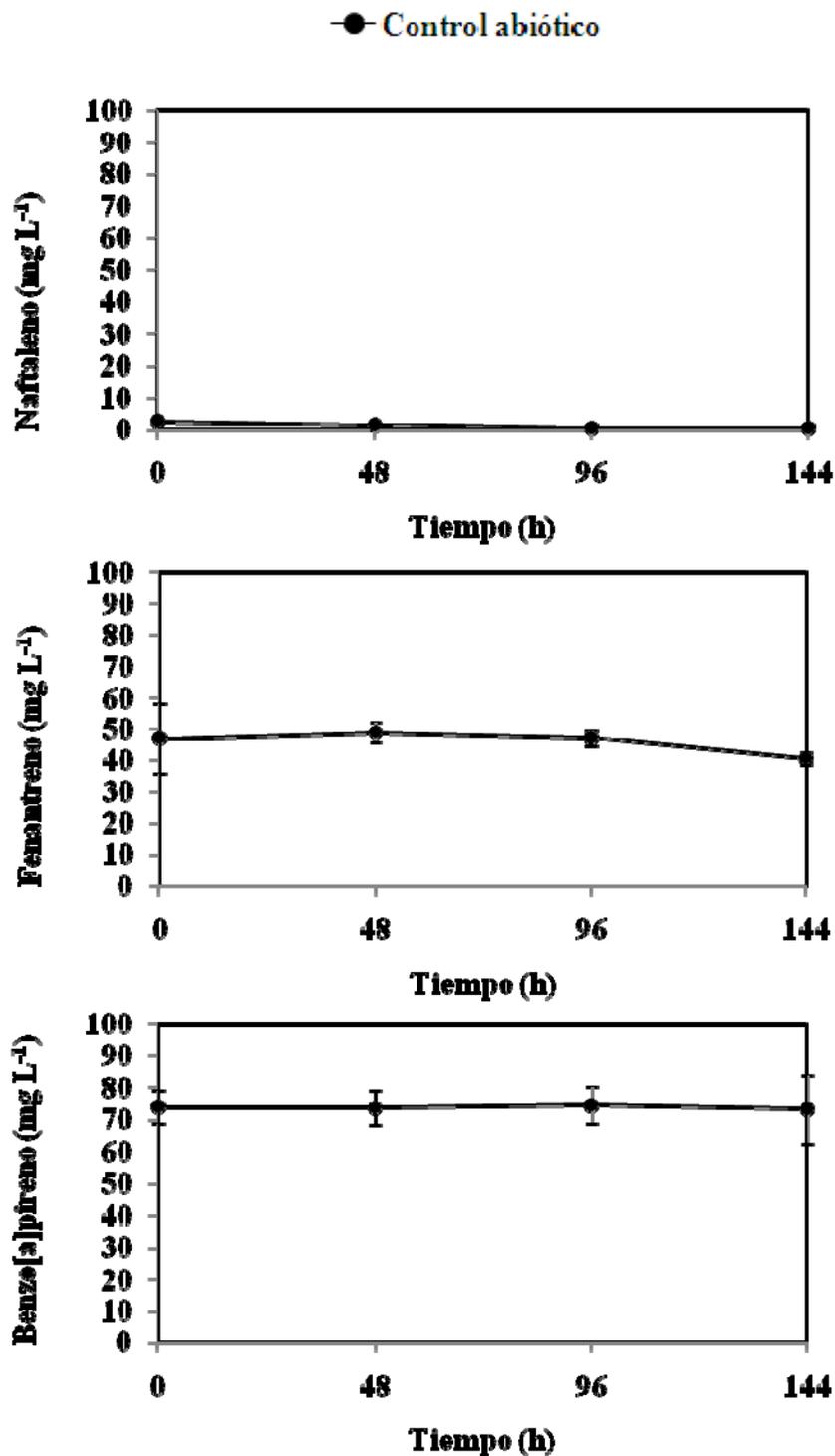


Figura 5.14. Reducción de la concentración inicial (100 mg L⁻¹) de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en los controles abióticos debido a factores externos, evaluados cada 48 h por seis días (n=3, Media ± error estándar).

● Control abiótico ▲ *Trichoderma virens* ○ *Trichoderma viride*

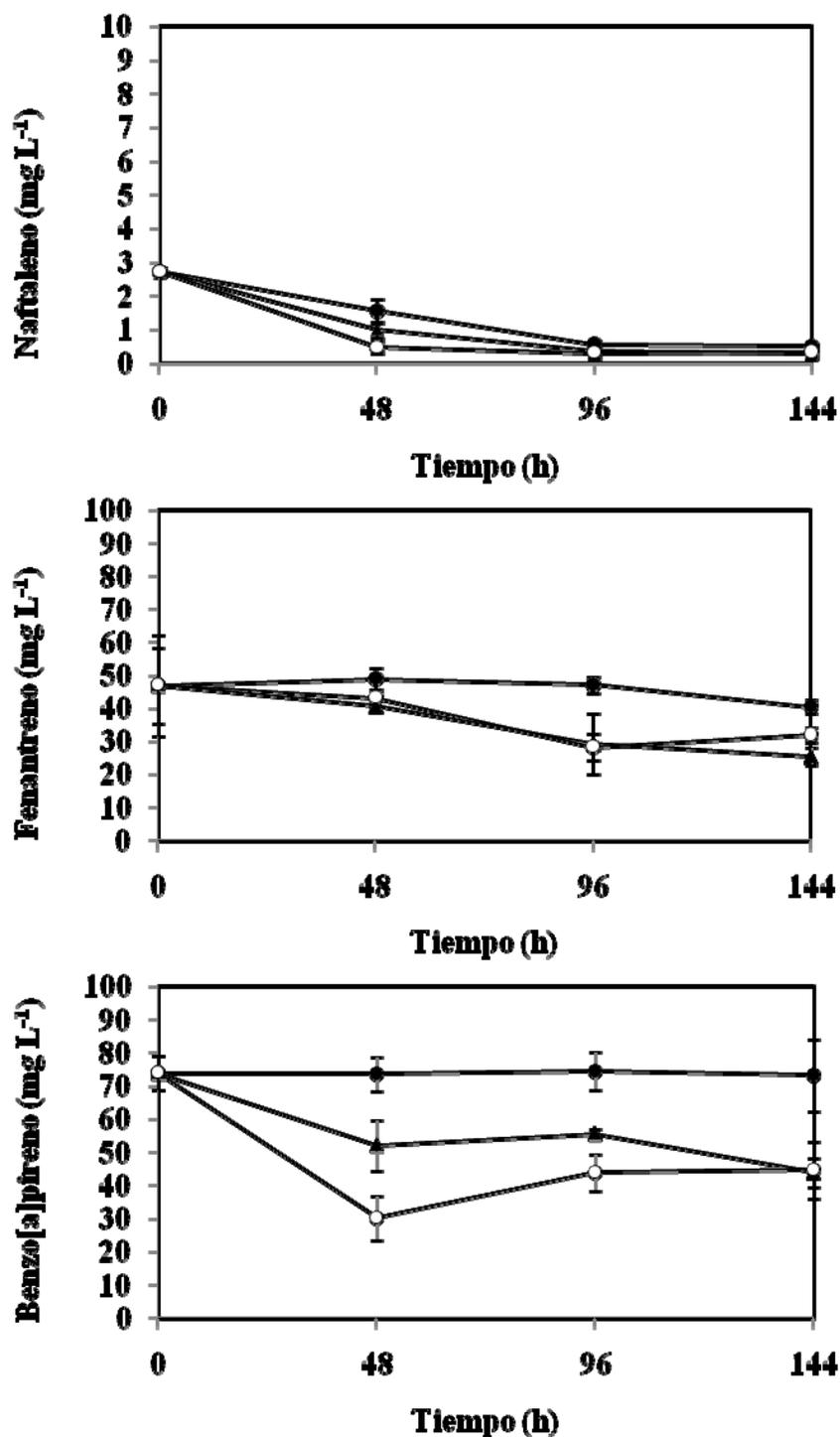


Figura 5.15. Reducción en la concentración de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno provocada por las cepas fúngicas de *Trichoderma* con respecto a la concentración del control abiótico, evaluados cada 48 h por seis días (n=3, Media ± error estándar).

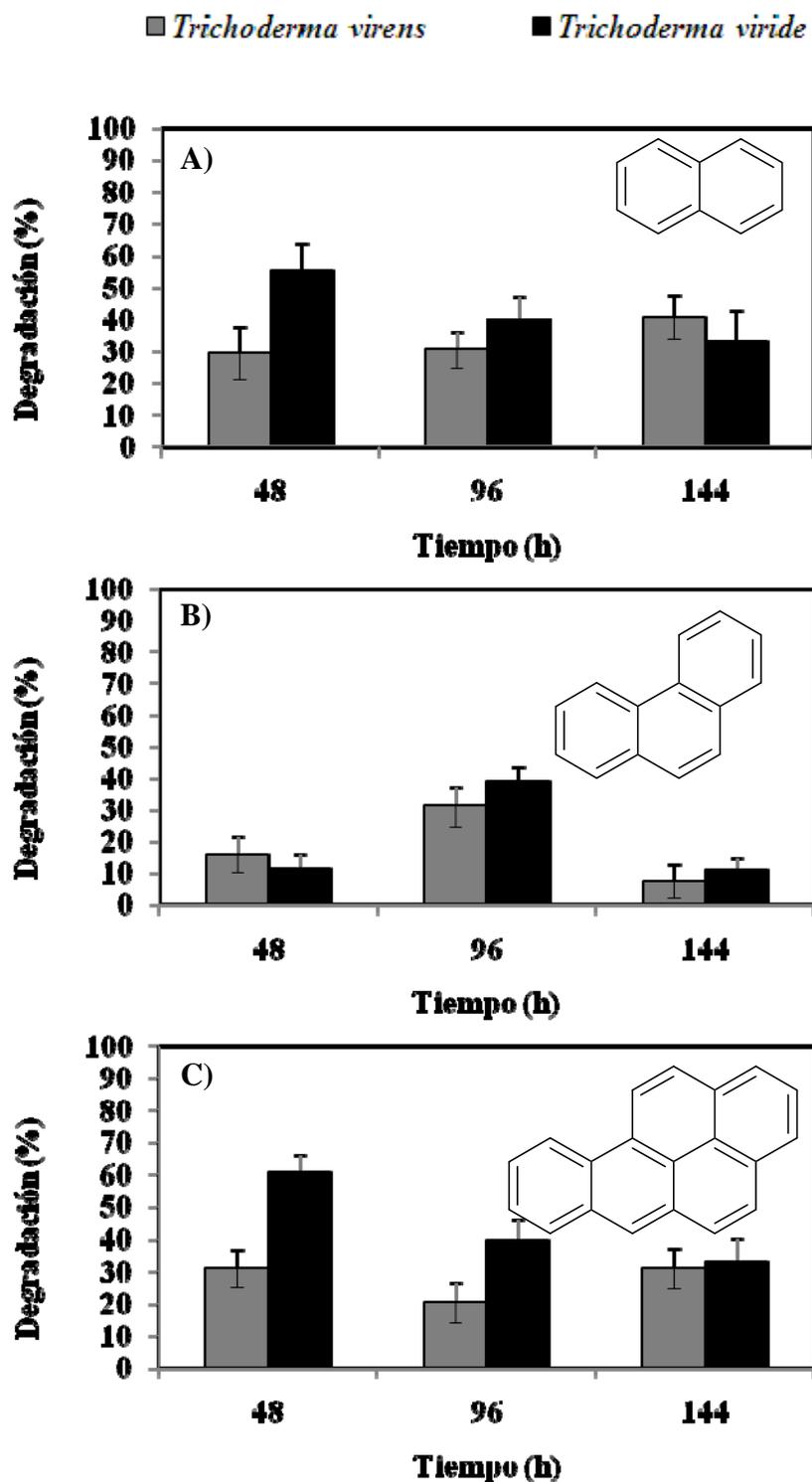


Figura 5.16. Por ciento de degradación de A) naftaleno, B) fenantreno y C) benzo[a]pireno por las cepas fúngicas de *Trichoderma*, evaluados cada 48 h por seis días (n=3, Media \pm error estándar).

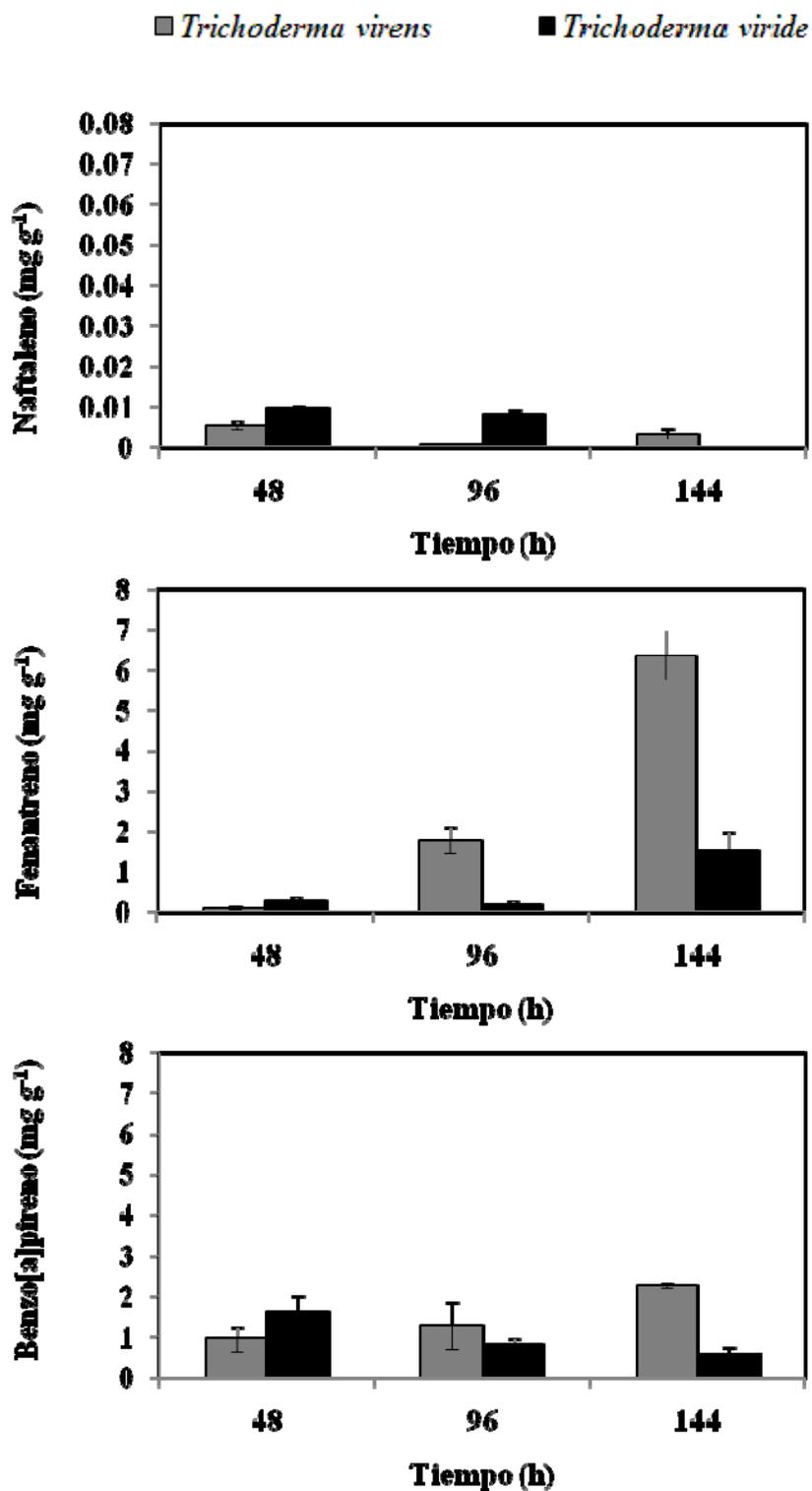


Figura 5.17. Acumulación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno por el micelio fúngico de dos cepas de *Trichoderma*, evaluada cada 48 h por seis días (n=3, Media \pm error estándar).

5.3.4.2.6.2. Degradación y acumulación de fenantreno

La degradación de fenantreno por *T. virens* y *T. viride* fue estadísticamente igual a las 48, 96 y 144 h; sin embargo, *T. viride* presentó mayor degradación (39%) a las 96 h. Ambas cepas fúngicas presentaron la tendencia de tener un punto máximo de degradación y después una caída (**Fig. 5.16**). Tanto el micelio de *T. virens* y el micelio de *T. viride* presentaron similar acumulación de fenantreno a las 48 y 96 h, aunque a las 144 h se observaron diferencias en su acumulación. El micelio de *T. virens* acumuló ($P \leq 0.001$) significativamente mayor cantidad de fenantreno en su interior en comparación con el micelio de *T. viride* (**Fig. 5.17**).

5.3.4.2.6.3. Degradación y acumulación de benzo[a]pireno.

Analizando la degradación de benzo[a]pireno fueron observadas diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas fúngicas utilizadas. A las 48 y 96 h *T. viride* incrementó más su degradación de benzo[a]pireno que *T. virens*. Mientras que a las 144 h no se observaron diferencias en la degradación de benzo[a]pireno entre las cepas estudiadas. La tendencia de degradación es diferente para cada cepa fúngica de *Trichoderma*, *T. viride* inicialmente presentó una máxima degradación (61%), posteriormente se observó un decremento en su degradación al transcurrir del tiempo (**Fig. 5.16**). Pero *T. virens* mostró una tendencia casi constante en los tres tiempos evaluados.

El micelio fúngico de *T. virens* y el micelio fúngico de *T. viride* producen efectos iguales con respecto a la acumulación de benzo[a]pireno a las 48 y 96 h, aunque a las 144 h hay diferencias en su acumulación; el micelio fúngico de *T. virens* acumula

($P \leq 0.001$) significativamente mayor cantidad de benzo[a]pireno en su interior que el micelio fúngico de *T. viride* (Fig. 5.17).

□ Control ■ Naftaleno ▨ Fenantreno ■ Benzo[a]pireno

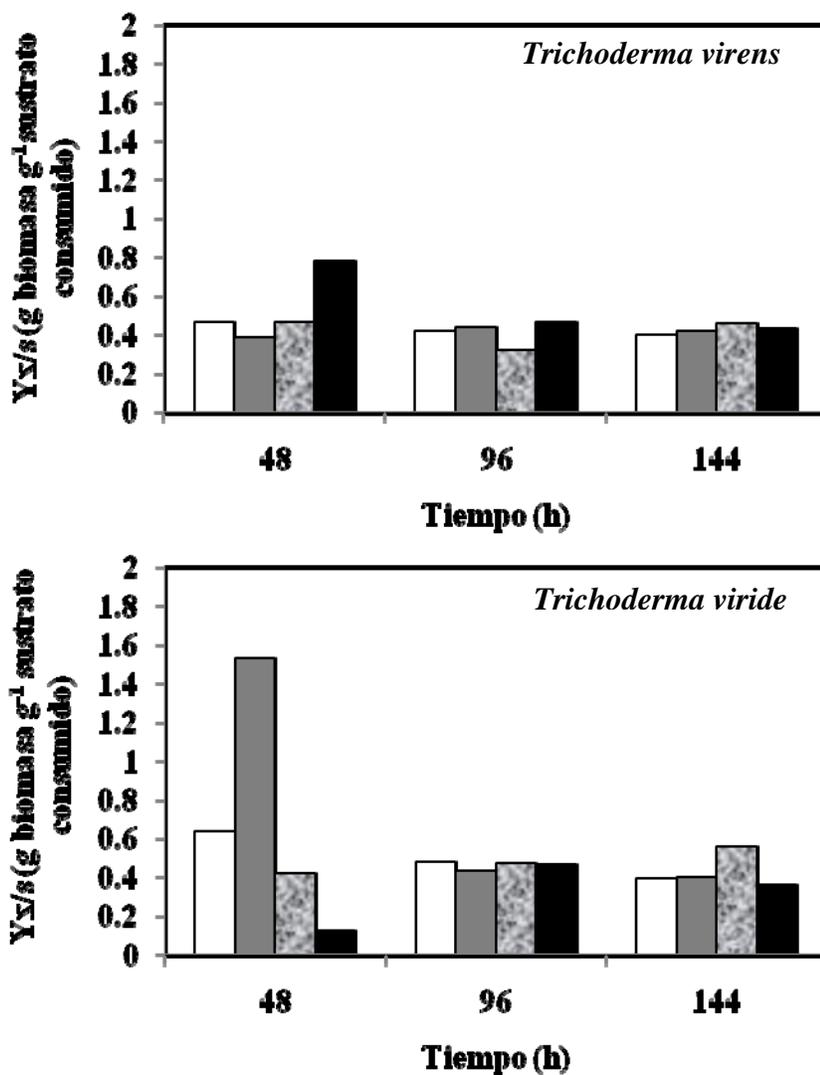


Figura 5.18. Rendimiento de *T. virens* y *T. viride* expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno.

□ Control ■ Naftaleno ▨ Fenantreno ■ Benzo[a]pireno

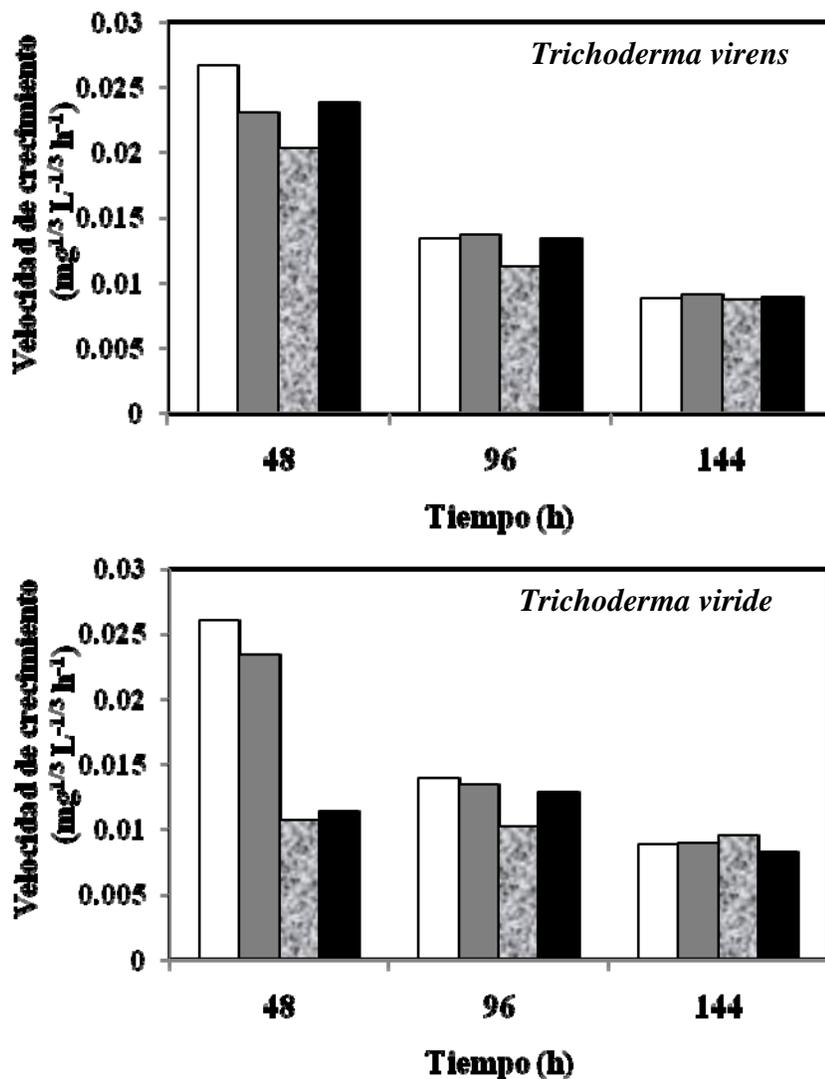


Figura 5.19. Velocidad de crecimiento de *T. virens* y *T. viride* expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno.

5.3.4.2.6.4. Determinación de parámetros cinéticos

Los cálculos estimados para la determinación del rendimiento de *T. virens* y *T. viride* sin HPA y con HPA tuvieron mayor variación a las 48 h. La relación entre la biomasa producida y el consumo de glucosa ($Y_{x/s}$) fue disminuida por la presencia de

naftaleno a las 48 h en *T. virens*, e incrementada por la presencia de benzo[*a*]pireno. Los tratamientos inoculados con *T. virens* y expuestos a fenantreno disminuyeron su rendimiento a las 96 h, mientras que los tratamientos con benzo[*a*]pireno disminuyeron su rendimiento al transcurrir del tiempo. El rendimiento de los tratamientos inoculados con *T. viride* y expuestos a naftaleno incrementaron a las 48 h, mientras que los tratamientos expuestos a fenantreno y benzo[*a*]pireno disminuyeron.

Las variaciones en los rendimientos de ambas cepas fúngicas se perdieron a las 144 h. La velocidad de crecimiento de ambas cepas fúngicas disminuyó al transcurrir el tiempo, lo cual indica que el crecimiento del hongo decrece, posiblemente debido a que la fuente de carbono se vá agotando con el paso del tiempo. Los tratamientos expuestos a fenantreno de ambas cepas, disminuyeron su velocidad de crecimiento en las dos primeras evaluaciones en comparación con los tratamientos expuestos a naftaleno y benzo[*a*]pireno. A las 144 h la velocidad de crecimiento de todos los tratamientos no presentó variaciones.

5.3.5. Discusión

5.3.5.1. Elección de un medio de cultivo líquido para las pruebas de degradación de poliaromáticos.

El medio de cultivo mínimo-sin fuente de carbono utilizado no permitió el desarrollo de la cepa de *Trichoderma*, lo cual resalta la importancia de incluir una fuente de carbono para cualquier organismo. Una fuente de carbono provee la energía necesaria para satisfacer las funciones metabólicas y la biosíntesis de los constituyentes celulares de cualquier microorganismo (Cooke, 1968; Wainwright, 1988). El crecimiento fúngico

es un fenómeno complejo que está directamente relacionado con los factores nutricionales tales como fuente de nitrógeno, fuente de carbono, elementos esenciales, vitaminas, pH, etc., y la ausencia o modificación de alguno de ellos repercute en el crecimiento fúngico.

Tomando en consideración lo anterior, el medio de cultivo fue modificado empleando dos fuentes de carbono diferentes (extracto de levadura y glucosa), otros elementos esenciales (Cu, Mn, Zn y Mo) y un compuesto poliaromático (naftaleno) para evaluar el efecto de este compuesto químico sobre el crecimiento del hongo en el medio de cultivo modificado. Las tres variables (biomasa fresca, biomasa seca y proteína fúngica) evaluadas indicaron que *T. virens* tuvo mejor crecimiento en presencia de glucosa (6 g L^{-1}), e incluso con naftaleno, de ahí que se haya optado por el medio con glucosa para realizar las pruebas de degradación de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.

Por otro lado, se conoce que microorganismos como las bacterias son capaces de utilizar hidrocarburos poliaromáticos como única fuente de carbono (Meyer *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2002), gracias a esta habilidad tienen mayor capacidad de degradación de hidrocarburos poliaromáticos. El presente trabajo demuestra que hongos como *Trichoderma* tienen poca habilidad para utilizar a los hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono, pues los resultados obtenidos indican que el desarrollo del hongo en ausencia de una fuente de carbono (simple) como extracto de levadura y glucosa, es casi nulo. También comprueban lo mencionado por Cerniglia (1993) que los hongos no son capaces de utilizar a los hidrocarburos poliaromáticos como única fuente de carbono y energía, pues estos microorganismos utilizan el co-metabolismo para

destoxificar su ambiente (Horvath, 1972; Gibson, 1991; Yadav y Reddy, 1993; Skinner *et al.*, 2009). Por tal razón, el medio de cultivo destinado para ensayos de biodegradación debe tener una fuente de carbono adicional al hidrocarburo poliaromático (Cerniglia, 1997). No obstante, la incorporación de otra fuente de carbono adicional como la glucosa puede enmascarar la degradación de varios hidrocarburos, pues se ha reportado que se apagan un gran número de genes en bacterias y hongos en presencia de glucosa; con ello, se afecta considerablemente la síntesis de enzimas capaces de metabolizar otras fuentes de carbono como los hidrocarburos poliaromáticos (Ronne, 1995). La concentración de glucosa que usualmente se ha empleado en diferentes trabajos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos utilizando hongos filamentosos, es de 10 g por litro (Hadibarata *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Arun *et al.*, 2008; Hadibarata y Tachibana, 2009; Patel *et al.*, 2009; Pozdnyakova *et al.*, 2010). En el presente trabajo, para evitar el enmascaramiento en la degradación de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno por las cepas fúngicas de *Trichoderma* se utilizó 0.6% de glucosa en el medio de cultivo. Verdin *et al.* (2005b) mencionan que la degradación de benzo[*a*]pireno por *Fusarium solani* incrementó de 9 a 50%, al incrementar la concentración de glucosa de 1 a 10 g L⁻¹ (0.1 y 1%), respectivamente. Considerando esta información, es evidente que para los hongos filamentosos es necesario optimizar la concentración adecuada de glucosa con la cual el hongo pueda incrementar su degradación de hidrocarburos poliaromáticos.

5.3.5.2. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Inoculación con esporas y con micelio fúngico

La manera de inocular depende de la facilidad que tenga el hongo filamentoso de producir suficientes esporas con alta viabilidad de germinación, y en caso de presentarse

otro tipo de inconvenientes, se puede optar por la inoculación con micelio (Griffin, 1994). Cuando un medio sólido se inocula con micelio, éste crece rápidamente absorbiendo los nutrientes presentes en el medio de cultivo y se va expandiendo a nuevas áreas, aunque la esporulación y frutificación es lenta hasta que el micelio haya alcanzado cierto estado de madurez (Timnick *et al.*, 1952). Sin embargo, en un medio líquido el micelio inoculado forma tapetes o agregados de micelio bastante comprimidos (Guarro *et al.*, 1994); mientras que las esporas inoculadas en medio sólido cubren en primera instancia el área de la gota de esporas inoculadas, y posteriormente se genera micelio que crece de la misma manera que en la inoculación con micelio (Timnick *et al.*, 1952). También la inoculación de esporas en un medio líquido genera una serie de agregados de micelio muy compactos.

En este estudio se utilizó la inoculación con micelio y la inoculación con esporas para evaluar posibles diferencias en el crecimiento de dos cepas de *Trichoderma* al ser expuestas a fenantreno. Sin embargo, en las variables evaluadas (biomasa fúngica seca, biomasa fúngica fresca, proteína fúngica, y pH), no se observaron diferencias estadísticas al inocular esporas o micelio en los tratamientos. Aunque, se observó que la biomasa fúngica seca y fresca de *T. viride* incrementó con fenantreno a las 144 h al inocular con esporas. Lo anterior concuerda con el incremento en la germinación de esporas de *Rhizopus arrhizus* al ser expuestas a 50 mg L⁻¹ de pireno (Shiosaki *et al.*, 2008).

Por otro lado, es importante mencionar que la forma de inoculación repercute de manera considerable en la biodegradación. Potin *et al.* (2004) reportaron un incremento en la degradación de diferentes hidrocarburos poliaromáticos (naftaleno, pireno, fluoreno, antraceno, benzo[*a*]pireno, criseno, fenantreno, fluoranteno, benzo[*b*]fluoranteno,

benzo[k]fluoranteno, etc.) cuando los tratamientos fueron inoculados con el micelio de los hongos probados (*Coniothyrium* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Doratomyces* sp., *Phialophora* sp., *Scedosporium* sp., *Sphaeropsis* sp., *Stachybotrys* sp., y *Trichoderma* sp.).

5.3.5.3. Ensayos previos de biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos: Selección de una concentración apropiada de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno

La degradación de hidrocarburos poliaromáticos por microorganismos depende de variables biológicas, físicas y químicas como pH, temperatura, concentración, genotipo microbiano, estructura química, presión, salinidad, tipo de cultivo, etc. (Vidali, 2001; Martín-Moreno *et al.*, 2004). Otro factor que se debe considerar en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos es la toxicidad de estos compuestos. La toxicidad de cualquier sustancia química esta en función de su dosis, frase acuñada por el químico suizo Paracelsus (1493-1541) que hasta nuestros días se considera como un axioma de la toxicología moderna (Deichmann *et al.*, 1986; Stirling, 2006). Tomando en consideración este axioma en los ensayos de biodegradación de poliaromáticos, es necesario determinar la concentración óptima no letal del hidrocarburo poliaromático a probar, en la cual el microorganismo seleccionado sea capaz de desarrollarse adecuadamente e incrementar su capacidad de degradación. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se probaron tres concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno (50, 100 y 150 mg L⁻¹) ya que en ensayos previos se demostró que la dosis letal de los tres hidrocarburos poliaromáticos para las dos cepas fúngicas de *Trichoderma* fue de 300 mg L⁻¹. Las variables (biomasa fúngica seca, biomasa fúngica fresca y proteína fúngica) que se evaluaron para

determinar el efecto de las tres dosis empleadas en el crecimiento de las cepas fúngicas de *Trichoderma*, estadísticamente mostraron tener el mismo efecto que en los controles. Sin embargo, *T. virens* disminuyó considerablemente su biomasa fúngica fresca y seca ante 150 mg L⁻¹ de fenantreno y benzo[*a*]pireno, mientras que su concentración de proteína fúngica incrementó en esta dosis de fenantreno y benzo[*a*]pireno. En contraste, *T. viride* tuvo un comportamiento inverso al de *T. virens* en las mismas dosis de fenantreno y benzo[*a*]pireno. Estos comportamientos indicaron similitudes y diferencias que pueden tener dos cepas fúngicas pertenecientes al mismo género ante la presencia de hidrocarburos poliaromáticos, mismas que reflejan las características y potenciales de cada microorganismo.

De manera general, *T. virens* tiende a disminuir su crecimiento al aumentar la concentración del hidrocarburo poliaromático, mientras que *T. viride* incrementa su crecimiento. Saraswathy y Hallberg (2002) encontraron que la biomasa fúngica seca de *Penicillium simplicissimum*, *P. janthinellum*, *P. funiculosum*, *P. terrestre* y *Trichoderma harzianum*, mostró la misma tendencia en 50 y 100 mg L⁻¹ de pireno. En el presente trabajo se eligió utilizar la dosis de 100 mg L⁻¹ para los ensayos de degradación al no encontrarse diferencias estadísticas en el comportamiento de las variables evaluadas en las dos cepas fúngicas probadas.

5.3.5.4. Biodegradación de compuestos poliaromáticos por dos cepas de *Trichoderma*

Las variables evaluadas en los ensayos de biodegradación de las dos cepas de *Trichoderma* mostraron tendencias diferentes frente a los tres hidrocarburos poliaromáticos. La biomasa seca de *T. virens* y *T. viride* fue disminuida a las 48 h por la presencia de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno (100 mg L⁻¹) con respecto a los controles, pero a las 144 h, los tratamientos con *T. virens* ante hidrocarburos

poliaromáticos, no mostraron diferencias estadísticas en comparación con los controles. Es notorio que el desarrollo del hongo fue retardado por la presencia del hidrocarburo poliaromático en las primeras horas de evaluación. Sin embargo, pasando este período de adaptación el desarrollo del hongo fue estimulado en presencia de HPA.

La biomasa fresca del hongo también fue afectada por la presencia del hidrocarburo poliaromático en las primeras horas de evaluación, ya que a las 48 h la biomasa fúngica de los tratamientos ante HPA disminuyó en comparación con los controles; aunque a las 144 h, la biomasa fresca de *T. virens* tuvo mayor incremento en los tratamientos con HPA que en los controles. Esta tendencia fue observada de igual forma en los tratamientos con naftaleno y fenantreno de *T. viride*.

La proteína fúngica pueden estar relacionada con proteínas constitutivas, proteínas respiratorias (citocromos), enzimas intracelulares, enzimas extracelulares, transportadoras y/o receptores de membrana, toxinas fúngicas, hormonas, etc. (Haggis y Michie, 1969), lo cual es indicativo de la actividad metabólica del hongo. La concentración de proteínas totales en las cepas de *Trichoderma* probadas fue alterada por la presencia de los hidrocarburos poliaromáticos. Los controles de *T. virens* y *T. viride* tienden a disminuir su concentración al transcurrir del tiempo. *Trichoderma virens* expuesta a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno tiende a incrementar, disminuir e incrementar su concentración de proteínas fúngicas. Pero a las 144 h el fenantreno este hongo incrementa considerablemente su concentración de proteína fúngica, mientras que con benzo[*a*]pireno, la disminuye.

Por otro lado, *T. viride* se comporta de manera diferente a *T. virens* en presencia de HPA. El naftaleno tiende a aumentar la concentración de proteínas en *T. viride* en

comparación con el fenantreno y benzo[*a*]pireno los cuales producen la disminución de la concentración de proteína al transcurrir del tiempo.

Las diferencias encontradas en la concentración de proteína fúngica entre los controles y los tratamientos expuestos a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno de las dos cepas de *Trichoderma*, contrastan con lo reportado por Nikiforova *et al.* (2009) para *Pleurotus Ostreatus* D1, pues no encuentran ninguna variación en la concentración de proteínas entre los controles y los tratamientos expuestos a ácido ftálico, ácido- α -hidroxi- β -naftoico, fenantreno, antraceno, fluoreno, pireno, criseno y fluoranteno.

Existen pocos estudios detallados sobre el efecto del pH en el crecimiento de especies del género *Trichoderma*. La preferencia de un pH ácido por hongos del género *Trichoderma* para absorber nutrientes de un medio de cultivo es mencionado por Danielson y Davey (1973). El pH inicial en el medio de cultivo fue de 5.5, por lo que el hongo necesitó un pH ácido para iniciar su crecimiento. Lo anterior denota que es posible que ambas cepas fúngicas estén secretando algunos ácidos orgánicos para reducir el pH del medio de cultivo. Akintokun *et al.* (2007) encontraron que en medios de cultivo con roca fosfórica, *T. harzianum* y *T. isridae* fueron capaces de producir ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, glucónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido tartárico y ácido málico.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento del hongo esta directamente relacionado con el pH del medio de cultivo, ya que si el pH se encuentra entre 2.7-2.9, la biomasa fúngica incrementa considerablemente; pero si el pH se encuentra entre 4.7-5.0 la biomasa fúngica es casi nula. Cuando el pH del medio de cultivo estuvo entre 4.7-5.0 en los tratamientos con fenantreno en las primeras 48 h de incubación, el crecimiento

fúngico fue muy escaso, lo cual podría sugerir que el hidrocarburo poliaromático retardo la secreción de ácidos orgánicos por los hongos.

Las dos cepas de *Trichoderma* tienden a incrementar su consumo de glucosa al aumentar el tiempo de incubación. El control de *T. virens* consumió más glucosa a las 48 h. Sin embargo, la presencia de los hidrocarburos poliaromáticos en el medio de cultivo redujo el consumo de glucosa por el hongo.

La acumulación de hidrocarburos poliaromáticos en vesículas fúngicas es un fenómeno recientemente identificado (Verdin *et al.*, 2005b), pero se sabe que existen mecanismos involucrados en la acumulación de estos compuestos (Sikkema *et al.*, 1995). Wunch *et al.* (1997) reportan que el micelio de *Marasmiellus trojanus*, *Pleurotus sapidus*, *Aspergillus ochraceus*, *Hericium erinaceus* y *Phanerochaete chrysosporium* (ATTC) remueve del 95.0, 55.2, 44.9, 42.2 y 38.4% de benzo[a]pireno (20 mg L⁻¹), respectivamente, en condiciones de medio de cultivo líquido durante 17 días de incubación. Por lo anterior, el conocimiento de la acumulación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno en el micelio las dos cepas de *Trichoderma* probadas es de gran importancia.

El micelio de *T. virens* y *T. viride*, presentó un comportamiento similar con respecto a la acumulación de fenantreno, ya que su acumulación fue incrementada al transcurrir del tiempo. Esta tendencia también fue observada en el micelio de *T. virens* al ser expuesto a benzo[a]pireno. Sin embargo, el micelio fúngico de *T. viride* expuesto a benzo[a]pireno tiende a disminuir su acumulación al transcurrir del tiempo. El micelio de *T. virens* tiende a incrementar, disminuir e incrementar su acumulación de naftaleno,

mientras que el micelio fúngico de *T. viride* tiende a disminuir su acumulación de naftaleno al transcurrir el tiempo de incubación.

Las tendencias anteriores tienen que ver con las propiedades fisicoquímicas de cada hidrocarburo poliaromático, la producción de proteínas transportadoras de HPA y la composición química de las membranas celulares (Sikkema *et al.*, 1995). La baja acumulación de naftaleno por el micelio fúngico de ambas cepas se puede relacionar con la alta volatilidad de este poliaromático a temperatura ambiente. Aunque el micelio de ambas cepas de *Trichoderma* presentaron una mayor afinidad para acumular fenantreno que benzo[*a*]pireno, lo cual indica que podría haber una semejanza en la composición química del micelio en ambos hongos.

Analizando los resultados de degradación, es importante mencionar que las pérdidas de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno están directamente relacionadas con sus respectivas presiones de vapor. La presión de vapor para el naftaleno es de 0.23 mm Hg a 25 °C la cual es considerablemente más alta que la del fenantreno (6.8×10^{-4}) y benzo[*a*]pireno (5.6×10^{-9}) (Oja y Suuberg, 1998; Goldfarb y Suuberg, 2008). Esto indica que gran parte del naftaleno a temperatura ambiente se encuentra en la fase gaseosa, de ahí la gran pérdida de naftaleno que mostraron los controles abióticos.

Tomando en consideración las presiones de vapor, podemos ver que el benzo[*a*]pireno es el que a temperatura ambiente se encuentra mayoritariamente en la fase sólida, y los controles abióticos de benzo[*a*]pireno concuerdan con ello, al presentar menor pérdida con respecto a naftaleno y fenantreno. Por lo anterior, es recomendable tener mucho cuidado con el manejo y almacenamiento de los tratamientos expuestos a

hidrocarburos poliaromáticos especialmente con las sustancias químicas que tengan alta presión de vapor, en los ensayos de biodegradación.

Relacionando todas las variables evaluadas con la degradación de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno se observaron tendencias interesantes en los dos hongos evaluados. A las 48 h de incubación se encontró que ambas cepas fúngicas tuvieron bajo consumo de glucosa, baja biomasa fresca, baja concentración de proteína y baja biomasa seca. La degradación de naftaleno por *T. viride* fue incrementada al igual que su acumulación de naftaleno en el micelio, mientras que la degradación de naftaleno por *T. virens* disminuyó. En ambos casos aparentemente el hongo está empezando su desarrollo y *T. viride* podría estar empleando al naftaleno como una fuente de carbono alterna de manera más eficiente que *T. virens*. Pero, a las 96 h se observó que el consumo de glucosa incrementó al igual que la biomasa fúngica fresca y seca en las dos cepas de estudio. La degradación de naftaleno por *T. virens* incrementó, mientras, la degradación de naftaleno por *T. viride* disminuyó al igual que la acumulación de este poliaromático. La concentración de proteína fúngica incrementó para *T. viride* y disminuyó para *T. virens*. El incremento observado en las variables evaluadas podrían deberse a que hay mucho más células fúngicas en el medio de cultivo que a las 48 h.

A las 144 h, el consumo de glucosa siguió incrementando en ambas cepas fúngicas al igual que la concentración de proteína fúngica, la biomasa fresca y la biomasa seca. Debido a que es probable que ya no haya naftaleno en el medio de cultivo que las cepas fúngicas puedan degradar,

En el caso de fenantreno a las 48 h, las dos cepas fúngicas tuvieron bajo consumo de glucosa, baja biomasa fresca, baja biomasa seca, baja degradación y acumulación de

fenantreno. Lo anterior sugiere que el hongo estaba empezando a desarrollarse, ya que a las 96 h se obtuvo un incremento en el consumo de glucosa al igual que la degradación y acumulación de fenantreno, y la biomasa fúngica fresca y seca, aunque la concentración de proteína disminuyó. El incremento observado en las variables evaluadas podrían deberse a que el hongo duplicó su biomasa, incrementando así el número de células fúngicas en el medio de cultivo. A las 144 h el consumo de glucosa siguió incrementando al igual que la acumulación de fenantreno en el micelio, la concentración de proteína fúngica y la biomasa fúngica seca; sin embargo, la degradación de fenantreno disminuyó al igual que la biomasa fúngica fresca (excepto para *T. viride*). Existe la posibilidad de que el hongo haya mantenido su duplicación del crecimiento y que el fenantreno haya dejado de ser tan tóxico para el hongo, por lo cual la degradación de este compuesto químico disminuyó. No obstante, el hongo también podría estar utilizando otros mecanismos de destoxificación, o tal vez haya iniciado la fase de muerte celular.

La tendencia que presentaron las dos cepas de *Trichoderma* para la degradación de fenantreno puede ser comparada con lo encontrado en la biodegradación de 2,4,6-triclorofenol (150 a 230 μM) por *Phanerochaete chrysosporium*, donde la degradación del 2,4,6-triclorofenol disminuyó con el transcurso del tiempo, y se detuvo a las 130 h de incubación (Ulmer *et al.*, 1983; Armenante *et al.*, 1994).

Las dos especies de *Trichoderma* expuestas a benzo[*a*]pireno a las 48 h, tuvieron baja acumulación de benzo[*a*]pireno, baja biomasa fresca y seca, y bajo consumo de glucosa, aunque incrementaron su degradación y su concentración de proteína fúngica. Lo anterior permite sugerir que se estén produciendo enzimas capaces de biotransformar al benzo[*a*]pireno en sustancias que puedan ser metabolizadas como una fuente de

carbono alterna. Además, existe la posibilidad de que algunas enzimas puedan transportar al benzo[a]pireno al interior del citoplasma para ser almacenado en compartimientos que propicien su inmovilización. Aunque también es posible que todos los mecanismos mencionados sean empleados por las dos especies de *Trichoderma*.

Tomando en consideración lo anterior, se puede decir que *T. viride* utilizó al benzo[a]pireno de una manera más eficiente que *T. virens*. A las 96 h, se observó que el consumo de glucosa incrementó al igual que la acumulación de benzo[a]pireno, la biomasa fúngica fresca y seca; aunque la degradación de benzo[a]pireno disminuyó al igual que la concentración de proteína fúngica en ambas cepas. Lo anterior podría sugerir que la biodegradación de benzo[a]pireno está directamente relacionada con la concentración de proteína fúngica. Finalmente, a las 144 h, se encontró que el consumo de glucosa en ambos casos incrementó al igual que la concentración de proteína fúngica; sin embargo, la biomasa fresca y la biomasa seca de ambas cepas disminuyó. No obstante, la degradación observada para *T. virens* incrementó al igual que la acumulación de benzo[a]pireno, pero la degradación en *T. viride* disminuyó al igual que su acumulación de benzo[a]pireno. En el caso de benzo[a]pireno se observó mayor variación en el comportamiento de los dos hongos que con respecto al fenantreno. Estas variaciones podrían relacionarse con la inducción de proteínas específicas encontradas en *Fusarium solani* ante benzo[a]pireno, las cuales están involucradas en las rutas metabólicas de benzo[a]pireno como inductoras de degradación y transportadoras de benzo[a]pireno (Verdin *et al.*, 2005a).

Un factor limitante en la degradación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno parece estar involucrado con la liberación de enzimas extracelulares más que con la

biomasa micelial (Armenante *et al.*, 1994). Además, es evidente que el mecanismo de degradación y de acumulación se presenta en las dos especies de *Trichoderma* durante la destoxificación de fenantreno, benzo[*a*]pireno y naftaleno.

Desafortunadamente, no se pudo encontrar un estudio sobre la degradación de naftaleno por especies del género *Trichoderma* con la cual podamos comparar los resultados del presente estudio. Por lo anterior, se hace una comparación con algunos otros hongos del grupo de los basidiomicetos. Arun *et al.* (2008) reportan que la degradación de naftaleno 1 mg mL^{-1} ($\approx 1000 \text{ mg L}^{-1}$, 7.8 mM) por varios hongos como *Pycnoporus sanguineus* (12.0%), *Coriolus versicolor* (27.4%), *Pleurotus ostreatus* (29.4%), *Fomitopsis palustris* (19.5%) y *Daedalea elegans* (35.8%), durante 28 días de incubación. Mientras que la degradación de naftaleno 100 mg L^{-1} (0.78 mM) obtenida para *T. virens* y *T. viride* fue del 41 y 55%, respectivamente, durante dos días de incubación. La concentración empleada para los hongos del grupo de los basidiomicetos fue 10 veces mayor que la utilizada en este estudio; a pesar de ello, *T. viride* presentó una degradación de naftaleno aceptable, aunque es evidente que los hongos del grupo de los basidiomicetos poseen una gran capacidad de tolerar y degradar altas concentraciones de naftaleno.

Comparando la degradación de fenantreno observada en otras especies de *Trichoderma* se encuentra que *T. harzianum* degradó menos del 10% de una concentración inicial de 400 mg L^{-1} ($\approx 2.2 \text{ mM}$) de fenantreno, durante 28 días de incubación (Matsubara *et al.*, 2006). Lo anterior contrasta con la degradación indicada para *Trichoderma* sp. S019 (72%) a partir de una concentración inicial de 0.1 mM de fenantreno ($\approx 17.8 \text{ mg L}^{-1}$), durante 30 días de incubación (Hadibarata *et al.*, 2007). En

tanto que en este estudio, la degradación de fenantreno (100 mg L^{-1} , $\approx 0.56 \text{ mM}$) obtenida para *T. virens* y para *T. viride* fue del 31% y 39%, respectivamente, durante 4 días de incubación, y esta degradación disminuyó al transcurrir el tiempo. Lo anterior permite inferir que la degradación de fenantreno por especies del género *Trichoderma* está en función de la concentración del compuesto poliaromático, pues a baja concentración mayor degradación, y viceversa. También se pudo observar que la degradación máxima de las cepas de estudio fue obtenida en corto tiempo, en comparación con las otras dos investigaciones mencionadas en la discusión.

Por otro lado, se ha reportado que la degradación de benzo[*a*]pireno 0.04 mM ($\approx 10 \text{ mg L}^{-1}$) por *T. viride* fue del 50%, durante 30 días de incubación (Verdin *et al.*, 2004). Sin embargo, en el presente estudio, la degradación de benzo[*a*]pireno (100 mg L^{-1} , $\approx 0.40 \text{ mM}$) obtenida para *T. viride* durante los primeros 2 días de incubación fue del 61%, mientras que la máxima degradación obtenida para *T. virens* fue del 31%, durante el segundo y sexto día de incubación. Sin embargo, la concentración utilizada de benzo[*a*]pireno en el presente estudio de degradación fue 10 veces mayor que aquella utilizada el estudio realizado por Verdin *et al.* (2004). Además, los tiempos en los que se obtiene la máxima degradación de este compuesto químico son relativamente muy cortos. Chulalaksananukul *et al.* (2006) reportan que *Fusarium* sp. E033 fue capaz de degradar del 65–70% de benzo[*a*]pireno (100 mg L^{-1}) durante 30 días de incubación, este resultado de degradación fue similar al obtenido con *T. viride* pero en un tiempo de incubación mucho más corto.

Con base en los resultados, se puede decir que *Trichoderma viride* fue mucho más eficiente para degradar benzo[*a*]pireno en comparación con *Trichoderma virens*, y que ambas cepas presentan diferente respuesta de degradación de este poliaromático.

5.4. CONCLUSIONES

El presente trabajo indica que la eficiencia de degradación de las especies del género *Trichoderma* está en función de la propia especie fúngica, la concentración del compuesto poliaromático, y las condiciones del cultivo. A pesar de esto y bajo las condiciones de cultivo probadas, las dos cepas de *Trichoderma* poseen un potencial de degradación aceptable para fenantreno, benzo[*a*]pireno y naftaleno. Sin embargo, la modificación de las condiciones del medio de cultivo podría favorecer la eficiencia de degradación de estos compuestos poliaromáticos. Lo anterior abre la posibilidad de utilizar estas dos especies de *Trichoderma* en sistemas de biorremediación para sitios contaminados con HPA.

CAPÍTULO VI
INFLUENCIA DE NAFTALENO Y FENANTRENO EN EL
METABOLISMO SECUNDARIO DE *Trichoderma virens* Y
Trichoderma viride
RESUMEN

Los microorganismos son capaces de sintetizar diversos compuestos químicos derivados de su metabolismo. Como metabolitos primarios se conocen las sustancias necesarias para el desarrollo del microorganismo, mientras que los metabolitos secundarios son considerados como no esenciales para la vida, aunque cumplen una función específica en cada organismo. Los hongos filamentosos producen diferentes tipos de metabolitos secundarios de importancia industrial, médica y agrícola. De las especies del género *Trichoderma* se han aislado distintos metabolitos secundarios como pironas, peptaiboles, antraquinonas, daucanos, konigininas, trichodermamidas, viridinas, viridiofunginas, etc., la mayoría de estos compuestos tiene actividad biológica. Sin embargo, las investigaciones que contemplan el efecto de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) en la producción de metabolitos secundarios, son nulas. El presente trabajo evaluó el efecto de naftaleno y fenantreno en la síntesis de los metabolitos secundarios producidos en un medio de cultivo líquido con crecimiento de dos cepas del género *Trichoderma*. La presencia de naftaleno y fenantreno en el medio de cultivo afectó la producción de metabolitos secundarios en las cepas de *T. virens* (CP1) y *T. viride* (CP4). Como se observa en los resultados, el efecto de naftaleno y fenantreno sobre el metabolismo secundario al parecer depende del medio de cultivo, de la especie fúngica, y de su estrategia de supervivencia.

Palabras clave: *Trichoderma*, metabolismo secundario, hidrocarburos poliaromáticos

CHAPTER VI
INFLUENCE OF NAPHTHALENE AND PHENANTHRENE ON THE
SECONDARY METABOLISM OF *Trichoderma virens* AND
Trichoderma viride

ABSTRACT

Microorganisms are able to synthesize several chemical compounds from their metabolism. The required substances involved in the growth and development of a microorganism are known as primary metabolites; in contrast secondary metabolites are non-essential for life although they play a specific role in each microorganism. Filamentous fungi produce several types of secondary metabolites that are important for the industry, medicine, and agriculture. From *Trichoderma* species several secondary metabolites have been isolated such as as pyrones, peptaibols, anthraquinones, daucanes, koniginins, trichodermamides, viridins, viridifungins, etc., and most of them have biological activity. However, research focused on evaluating the influence of polyaromatic hydrocarbons (PAH) on the production of fungal secondary metabolites, are scarce. The present work evaluated the effect of naphthalene and phenanthrene on the synthesis of secondary metabolites by two strains of *Trichoderma* in liquid media system. The presence of naphthalene or phenanthrene affected the production of secondary metabolites for the strains *T. virens* (CP1) and *T. viride* (CP4). Results show that the effect of both PAH on the fungal secondary metabolism depends on the culture media as well as on the fungal species and its survival strategy.

Key words: *Trichoderma*, secondary metabolism, polyaromatic hydrocarbons

6.1. INTRODUCCIÓN

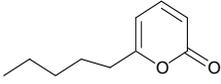
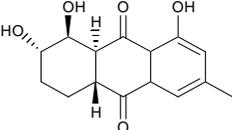
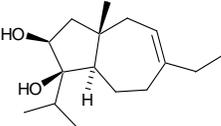
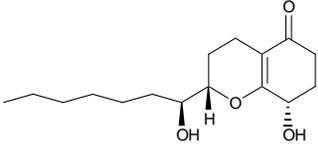
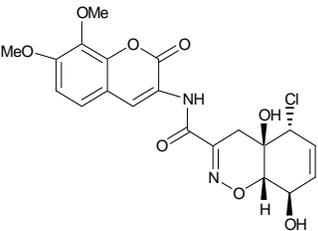
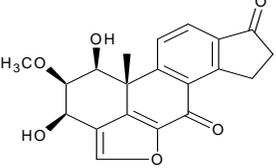
Los microorganismos son capaces de sintetizar diversos compuestos químicos derivados de su metabolismo. Como metabolitos primarios se conocen las sustancias necesarias para el desarrollo del microorganismo tales como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, etc. y se encuentran en la célula en concentraciones controladas por el organismo (Brock y Madigan, 1991; Herbert, 1994). Los metabolitos secundarios son considerados como no esenciales para la vida, sin embargo, los mecanismos que regulan el metabolismo primario están implicados en la regulación del metabolismo secundario en aquellas circunstancias en las que los sustratos normales no pueden ser utilizados para el desarrollo normal de la célula, por falta de nutrientes. (Drew y Demain, 1977; Kavanagh, 2005). Además los metabolitos secundarios cumplen una función específica en cada organismo (Herbert, 1994).

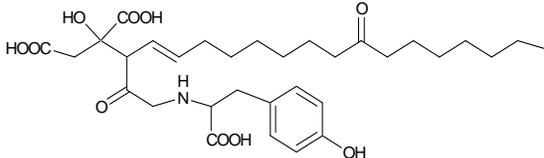
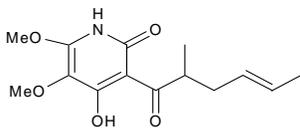
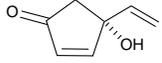
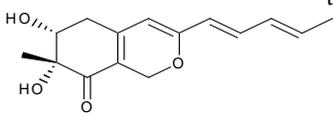
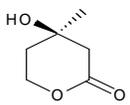
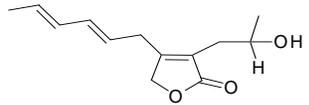
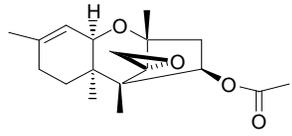
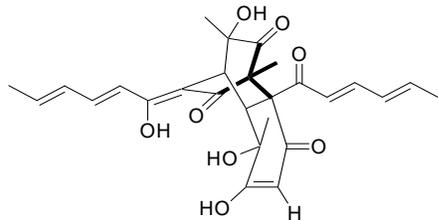
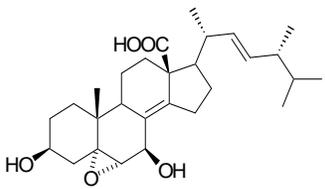
Los hongos filamentosos producen diferentes tipos de metabolitos secundarios de importancia industrial, médica y agrícola como micotoxinas, pigmentos, feromonas, antibióticos, etc. (Demain y Fang, 2000). El metabolismo secundario está asociado con los procesos de esporulación del hongo y se conocen tres categorías; 1) metabolitos que activan la esporulación (por ejemplo derivados del ácido linoléico), 2) pigmentos requeridos para la esporulación de las estructuras reproductivas (por ejemplo melaninas), y 3) metabolitos tóxicos secretados durante el crecimiento de la colonia fungica y en la aproximación del momento de la esporulación (por ejemplo, micotoxinas) (Champe y El-Zayat, 1989; Trail *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1998; Calvo *et al.*, 2001).

La producción de metabolitos secundarios comienza después del crecimiento del hongo frecuentemente cuando se entra en la fase estacionaria. De las especies del género

Trichoderma se han aislado distintos metabolitos secundarios como pironas, peptaiboles, antraquinonas, daucanos, koninginas, trichodermamidas, viridinas, viridiofunginas, etc., la mayoría de estos compuestos tiene actividad biológica (**Cuadro 6.1**).

CUADRO 6.1. METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *TRICHODERMA*

Estructura química	Familia/nombre	Especie fúngica	Actividad biológica	Referencia
	Pironas 6-pentil- α -pirona	<i>T. harzianum</i>	Fungicida	Serrano-Carreón <i>et al.</i> (2002) Dennis y Webster (1971)
	Antraquinonas trichodermaol	<i>Trichoderma</i> sp.	Antibacterial	Adachi <i>et al.</i> (1983)
	Daucanos trichocarano CAF-603	<i>T. virens</i>	Fungicida	Watanabe <i>et al.</i> (1990)
	Koninginas koninginina B	<i>T. harzianum</i>	Fungicida	Ghisalberti y Rowland (1993)
	Trichodermamidas trichodermamida B	<i>T. virens</i>	Citotóxica	Garo <i>et al.</i> (2003)
	Viridinas viridiol	<i>T. virens</i>	Fitotóxica	Howell y Stipanovic (1994)

Estructura química	Familia/nombre	Especie fúngica	Actividad biológica	Referencia
	Viridifunginas viridifungina A	<i>T. viride</i> <i>T. harzianum</i>	Fungicida	Harris <i>et al.</i> (1993) El-Hasan <i>et al.</i> (2009)
	Piridinas harzianopiridona	<i>T. harzianum</i>	Fungicida	Dickinson <i>et al.</i> (1989)
	Trichodenonas trichodenona A	<i>T. harzianum</i>	Citotóxica	Amagata <i>et al.</i> (1998)
	Azafilonas	<i>T. harzianum</i>	Citotóxica	Qian-Cutrone <i>et al.</i> (1996)
	Harzialactonas R-mevalonolactona	<i>T. harzianum</i>	Cosmética	Yamashita (2000)
	Butenolidas harzianolida	<i>T. harzianum</i>	Fungicida	Vinale <i>et al.</i> (2006)
	Trichotecenas trichodermin	<i>T. viride</i> <i>T. polysporum</i> <i>T. sporulosum</i>	Citotóxica	Choi <i>et al.</i> (1996)
	Bisorbicilinoides bisorbicilinol	<i>Trichoderma</i> sp.	Antioxidante	Abe <i>et al.</i> (1998)
	Ergosteroles ergokonina B	<i>T. koningii</i>	Antibiótica	Augustiniak <i>et al.</i> (1991)

Sin embargo, las investigaciones que contemplen el efecto de hidrocarburos poliaromáticos sobre la producción de metabolitos secundarios, son nulas. Por lo que el presente trabajo evaluó el efecto de naftaleno y fenantreno en la síntesis de los metabolitos secundarios producidos en un medio de cultivo líquido con crecimiento de dos cepas del género *Trichoderma*.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Preparación del inóculo

Las cepas de *Trichoderma* se crecieron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron de la suspensión mediante filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10^6 esporas mL^{-1} .

6.2.2. Condiciones del cultivo

A matraces erlenmeyer de 1000 mL de capacidad, se adicionaron 500 mL del medio mineral (g L^{-1}) 0.1 CaCl_2 ; 0.2 KCl ; 0.5 KH_2PO_4 ; 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.05 CuSO_4 ; 0.05 ZnSO_4 ; 0.43 MnSO_4 ; 0.05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$; 6 glucosa, pH 5.5. Previamente se prepararon soluciones madre de naftaleno y fenantreno a 20,000 mg L^{-1} disueltas en CH_2Cl_2 , de cada una de estas soluciones se tomaron 2.5 mL, y se aplicaron a los medios de cultivo correspondientes, para tener una concentración final de 100 mg L^{-1} de cada uno de los hidrocarburos poliaromáticos. Posteriormente, se agregaron 10 mL de la suspensión de esporas de cada una de las dos cepas de

Trichoderma, al medio de cultivo correspondiente. Los tratamientos fueron incubados a temperatura ambiente y oxigenados con una bomba de oxígeno por seis días.

6.2.3. Análisis de los tratamientos de las dos cepas de *Trichoderma* para la obtención de metabolitos secundarios.

Al término de la incubación, el micelio fue separado del medio de cultivo mediante filtración al vacío empleando papel filtro del número 4, e inmediatamente después, el filtrado obtenido fue liofilizado. Posteriormente, el material liofilizado fue lavado con acetona y metanol. Cada lavado fue concentrado y analizado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (Agilent Technologies® Mod. 1200) con una columna Eclipse plus C18, de 100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 3.5 μm de espesor de película, utilizando como fases metanol: agua (50:50), con una velocidad de flujo $0.200 \text{ mL min}^{-1}$ y un detector de masas (Agilent Technologies® Mod. 6140 Single Quad MS).

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cromatogramas obtenidos mostraron que después de la extracción con acetona y la liofilización del medio de cultivo donde creció *T. virens* en ausencia del contaminante, se obtuvieron cuatro compuestos. Sin embargo, cuando este hongo fue crecido en presencia de naftaleno y/o fenantreno, el cuarto y el primer compuesto observados en el control, desaparecieron como se aprecia en sus respectivos cromatogramas (**Fig. 6.1**)

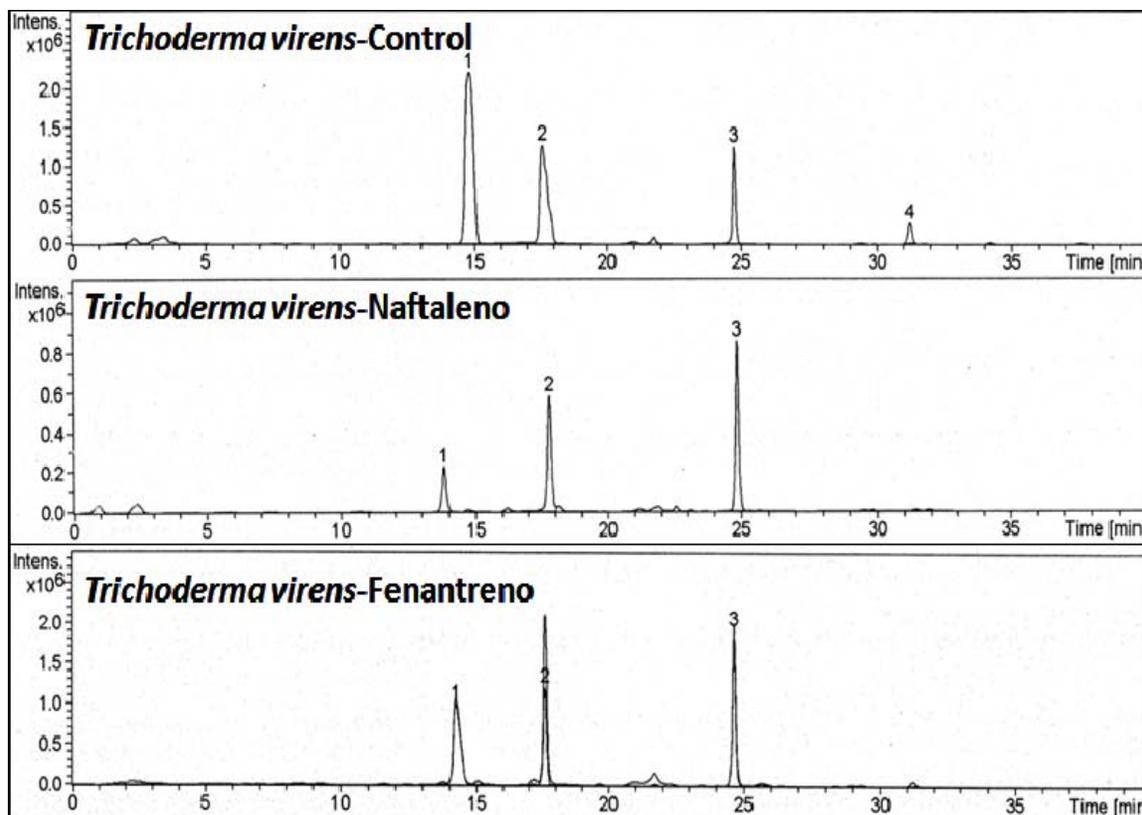


Figura 6.1. Cromatogramas del medio de cultivo extraído con acetona y liofilizado, correspondiente al cultivo de *Trichoderma virens* en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

CUADRO 6.2. DATOS CROMATOGRÁFICOS DE LOS TRATAMIENTOS DE *Trichoderma virens*.

Tratamiento	Disolvente	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Patrón de Fragmentación	Área
Control	Acetona	1	14.8	511.3, 267.4	46,026,215
			17.6	579.5, 369.5, 301.9	26,642,503
			24.7	803.9, 414.0	10,319,689
			31.2	554.1	2,786,028
Naftaleno	Acetona	1	13.8	563.5, 333.5	2,410,485
			17.8	579.5, 370.2, 301.8, 149.3	6,420,440
			24.8	803.9, 413.9	7,852,816
Fenantreno	Acetona	1	14.2	659.4, 284.4	18,663,623
			17.6	579.6, 370.2, 301.9	11,637,482
			24.6	804.1	16,128,519
Fenantreno	Metanol	1	2.5	753.3, 621.5, 323.8	853,975
			24.8	804.4, 416.1	3,349,455

*Los compuestos subrayados presentaron similares tiempos de retención y patrones de fragmentación.

El compuesto dos y el compuesto tres permanecieron en el medio de cultivo en presencia de naftaleno en proporciones más bajas, sin embargo, con fenantreno el compuesto tres se encuentra en una proporción 1.6 veces mayor que en el control (**Cuadro 6.2**). Los patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos en los diferentes tratamientos se muestran en la Figura 6.2 y 6.3.

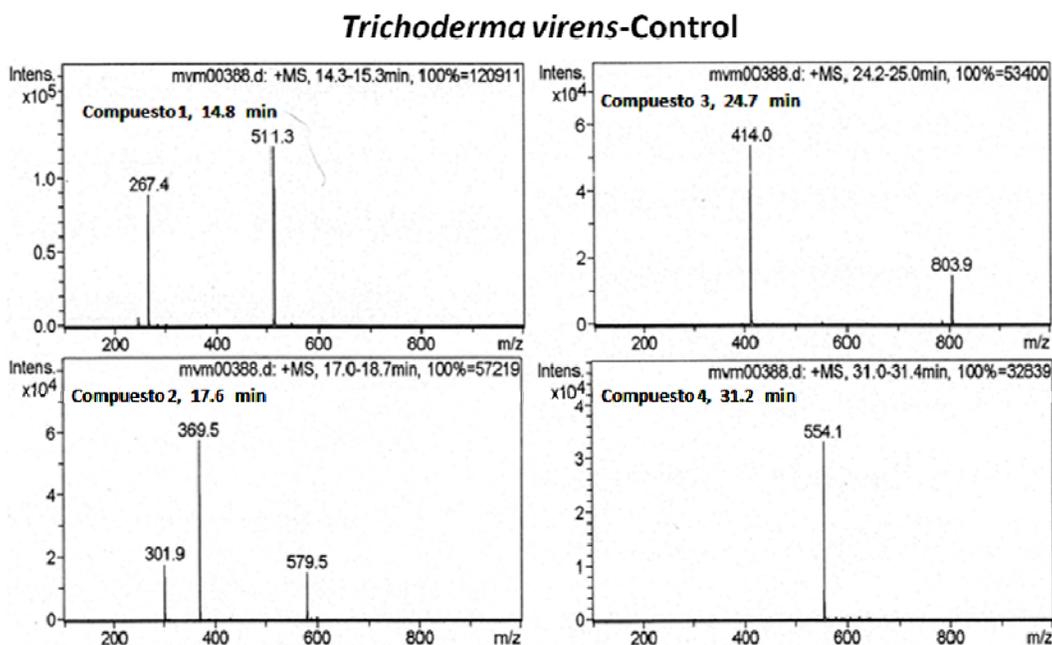


Figura 6.2. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al control de *Trichoderma virens* a las 144 h de incubación.

De los tratamientos extraídos con metanol, solo se analizó el liofilizado del medio de cultivo de *T. virens* expuesta a fenantreno, pues los otros dos tratamientos no se lograron obtener en este disolvente. El cromatograma del liofilizado del medio de cultivo de *T. virens* expuesto ante fenantreno, lavado con metanol, presentó únicamente dos compuestos.

El compuesto 2 en este cromatograma (**Fig. 6.4**), presentó un tiempo de retención y un patrón de fragmentación similar al del compuesto 3 obtenido en los tratamientos lavados con acetona, pero con una proporción (área) mucho más pequeña (**Cuadro 6.2**).

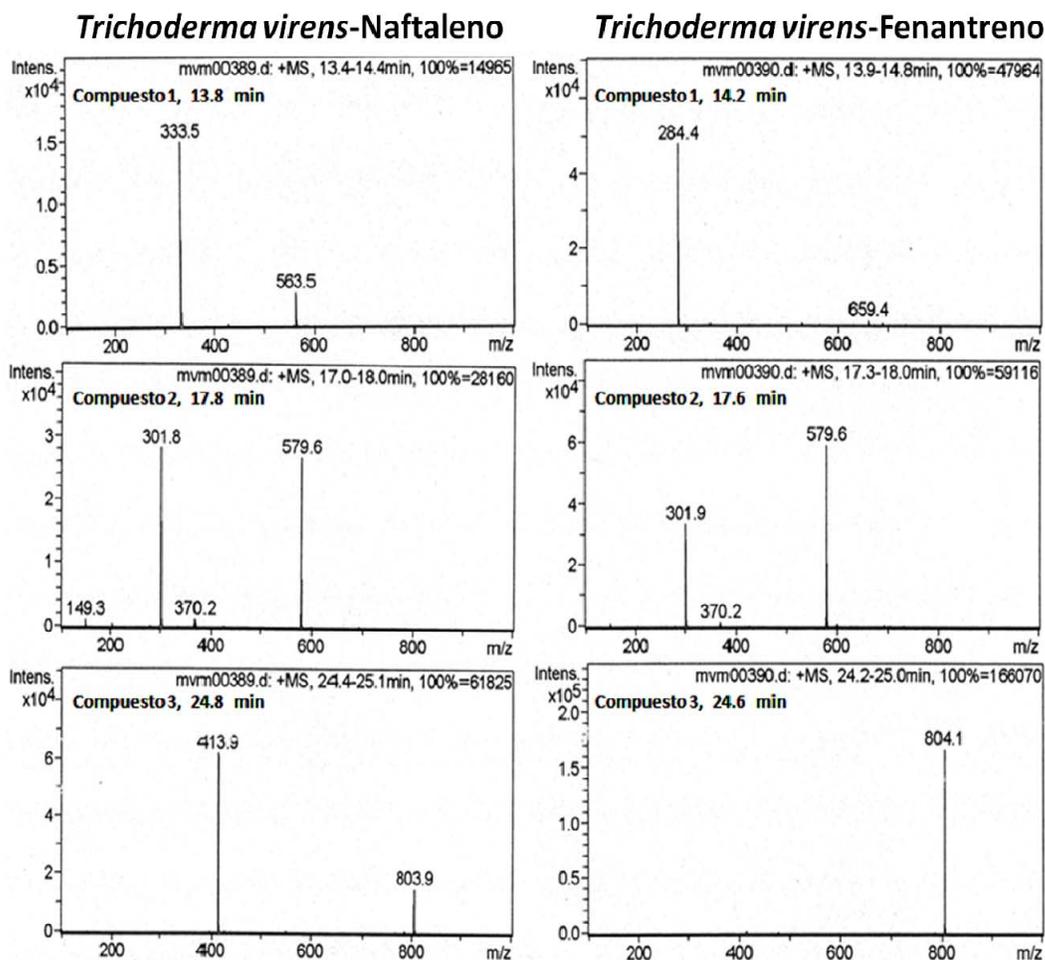


Figura 6.3. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al cultivo de *Trichoderma virens* en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

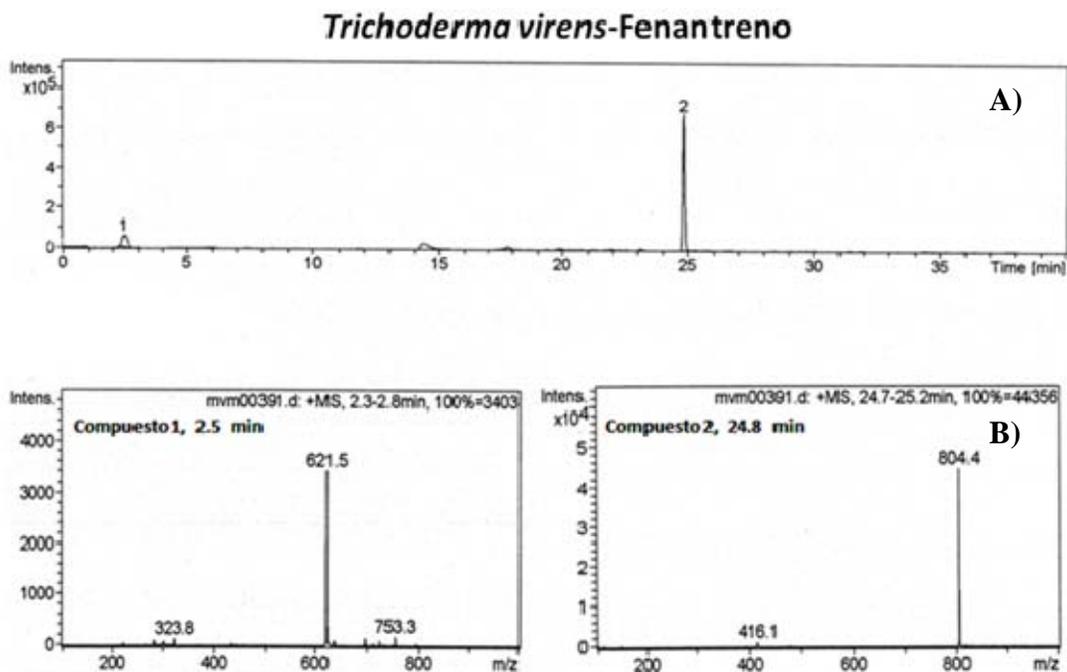


Figura 6.4. A) Cromatograma del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol de *Trichoderma virens* en presencia de fenantreno (100 mg L^{-1}). B) Patrones de fragmentación de dos compuestos obtenidos en el medio de cultivo liofilizado de *T. virens* en presencia de fenantreno (100 mg L^{-1}), extraído con metanol, a las 144 h de incubación.

Por otra parte, *T. viride* presentó un comportamiento completamente diferente al de *T. virens*. El cromatograma del liofilizado del medio de cultivo donde creció *T. viride*, extraído con acetona, presentó cuatro compuestos (**Fig. 6.5**). En contraste, el liofilizado del tratamiento expuesto a naftaleno de *T. viride* presentó ocho compuestos, mientras que el tratamiento expuesto a fenantreno presentó solamente dos compuestos. El compuesto uno encontrado en el liofilizado del medio de cultivo del control de *T. viride* (**Fig. 6.6**), también se encontró en el liofilizado del tratamiento expuesto a naftaleno (compuesto 2) en una baja proporción. El compuesto tres encontrado en el liofilizado del medio de cultivo del control de *T. viride*, de igual forma se encontró en el liofilizado del

tratamiento expuesto a naftaleno (compuesto 3) y fue 370 veces mayor, lo que sugiere que el naftaleno está afectando la concentración de este compuesto en el medio de cultivo (Cuadro 6.3).

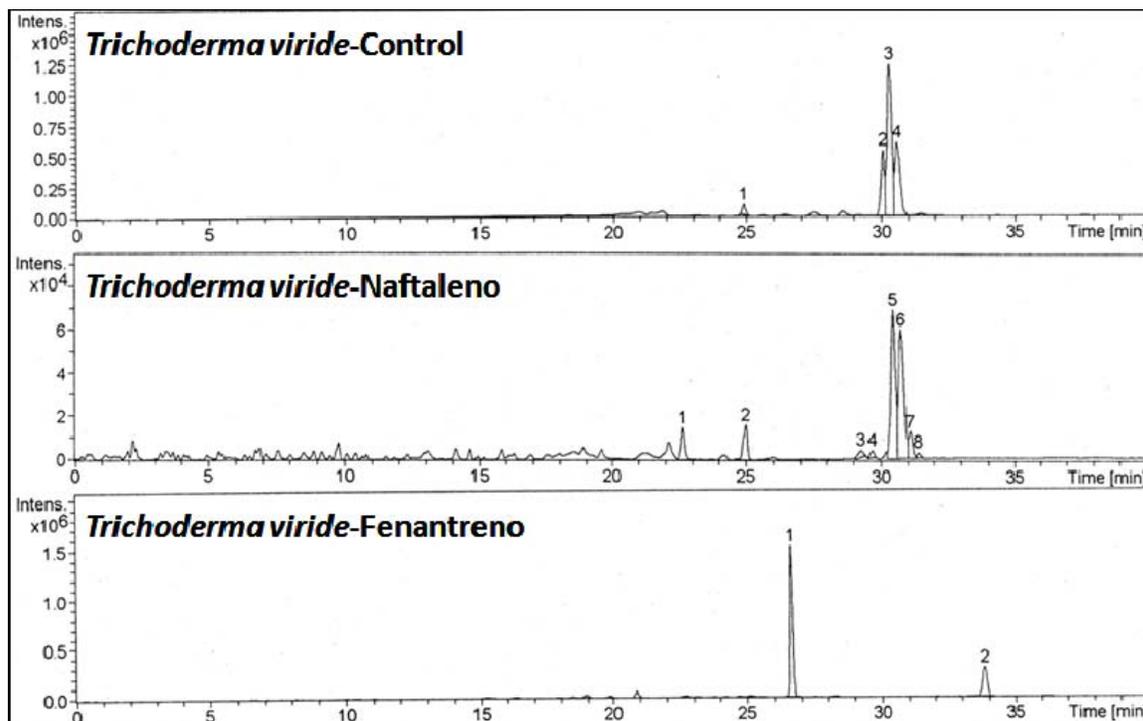


Figura 6.5. Cromatogramas del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona de *Trichoderma viride* en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

Finalmente, el compuesto cuatro encontrado en el liofilizado del medio de cultivo del control de *T. viride*, también se encontró en el tratamiento con naftaleno (compuesto 6), sin embargo el compuesto seis es 10 veces mayor que el compuesto cuatro del control. El naftaleno indujo la producción de cinco compuestos diferentes a los del control (Fig. 6.7); mientras que el fenantreno disminuyó la producción de estos compuestos, y con un compuesto diferente al control (Cuadro 6.3).

CUADRO 6.3. DATOS CROMATOGRÁFICOS DE LOS TRATAMIENTOS DE *Trichoderma viride*.

Tratamiento	Disolvente	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Patrón de Fragmentación	Área
Control	Acetona	1	24.9	804.6, 400.0, 150.4	719,691
		2	30.0	714.4	4,815,251
		3	30.3	739.5	15,543,815
		4	30.6	765.6	8,533,143
Naftaleno	Acetona	1	22.7	711.2	138,794
		2	25.0	804.5, 400.1	172,360
		3	29.2	739.1	41,944
		4	29.6	836.4	30,320
		5	30.4	740.7	825,282
		6	30.7	766.3	848,175
		7	31.1	754.6	124,105
		8	31.4	779.5	20,530
Fenantreno	Acetona	1	26.6	804.4	11,016,907
		2	33.8	767.4	3,824,680
Control	Metanol	1	22.6	711.1	384,798
		2	29.3	738.8	312,867
		3	29.7	836.7	62,943
		4	30.2	715.3	319,527
		5	30.4	740.5	1,680,385
		6	30.7	766.3	1,414,498
		7	31.1	754.9	235,937
		8	31.4	779.7	78,498
Naftaleno	Metanol	1	22.5	618.9, 540.6	68,010
		2	25.1	740.6, 645.9	100,024
		3	25.5	773.8, 673.3	96,682
		4	26.0	771.9, 701.2, 348.0	81,686
		5	27.1	804.3, 400.6	87,178
		6	29.0	745.9, 348.1	63,067
		7	36.4	768.0, 103.3	1,670,168
		8	39.1	817.3, 103.2	178,928
Fenantreno	Metanol	1	15.3	953.8, 172.8	199,813
		2	16.1	937.8, 821.4	181,541
		3	18.8	286.4	50,661
		4	19.7	868.6, 303.8, 149.9	36,229
		5	22.4	618.8, 540.0	92,880
		6	26.4	804.5, 401.0	143,508
		7	33.4	768.0	1,103,496

*Los compuestos subrayados presentaron similares tiempos de retención y patrones de fragmentación.

Para los tratamientos extraídos con metanol, el cromatograma del liofilizado del control de *T. viride*, presentó ocho compuestos (**Fig. 6.8**), al igual que el liofilizado del tratamiento expuesto a naftaleno; en contraste, el tratamiento expuesto a fenantreno presentó siete compuestos.

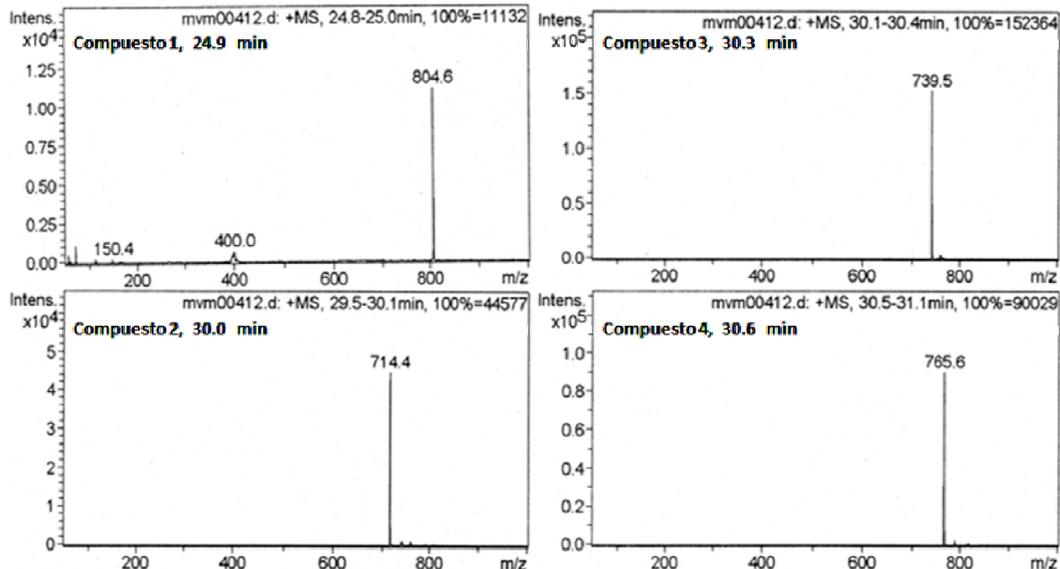
Trichoderma viride-Control

Figura 6.6. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al control de *Trichoderma viride* a las 144 h de incubación.

Los compuestos encontrados en el liofilizado del medio de cultivo del control de *T. viride* (**Fig. 6.9**), fueron diferentes a los compuestos encontrados en el tratamiento con naftaleno o con fenantreno. No obstante, se encontraron algunos compuestos con un tiempo de retención y un patrón de fragmentación similar en los liofilizados de los tratamientos expuestos a naftaleno y fenantreno (**Fig. 6.10**). El compuesto uno encontrado en el liofilizado del tratamiento expuesto a naftaleno, también se encontró en el liofilizado del tratamiento expuesto a fenantreno (compuesto 5). El compuesto cinco encontrado en el liofilizado del tratamiento expuesto a naftaleno de *T. viride*, se encontró también en el liofilizado del tratamiento ante fenantreno (compuesto 6) (**Fig. 6.11**).

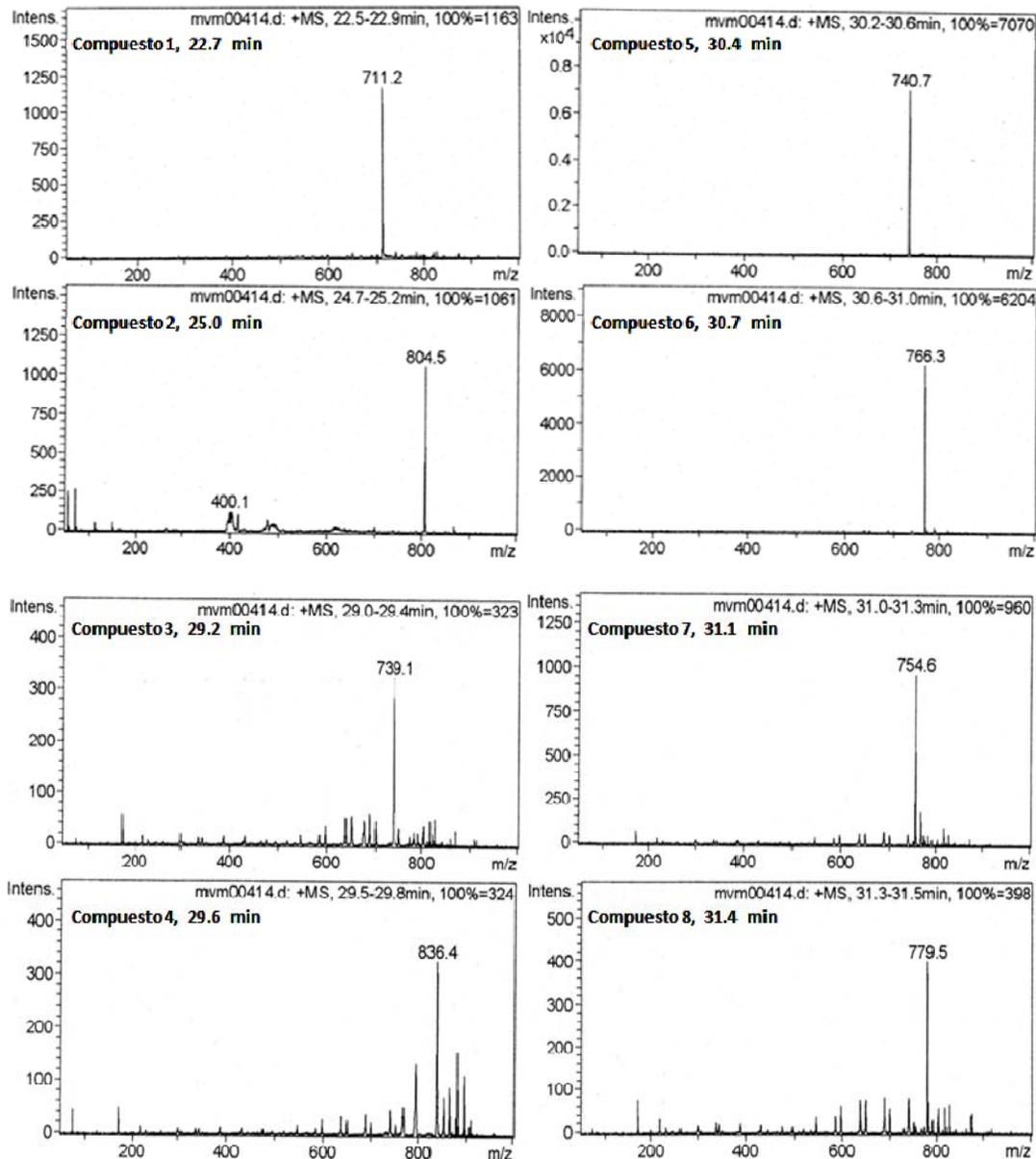
Trichoderma viride-Naftaleno

Figura 6.7. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con acetona, correspondiente al cultivo de *Trichoderma viride* en presencia de naftaleno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

Comparando el liofilizado del control de *T. viride* extraído en acetona con aquél extraído con metanol, se encontró que el compuesto dos, tres y cuatro del extracto lavado con acetona estuvieron presentes también en el extracto lavado con metanol (compuesto

cuatro, cinco y seis, respectivamente). Sin embargo, el liofilizado del tratamiento expuesto a naftaleno extraído con acetona o con metanol, presentaron diferentes compuestos. Para el liofilizado del tratamiento ante fenantreno extraído con acetona, se encontró que el compuesto uno y dos estuvieron también presentes en el liofilizado que fue extraído con metanol (compuesto seis y siete, respectivamente).

Los compuestos obtenidos en los liofilizados de los tratamientos de *T. virens* (CP1) fueron diferentes a los compuestos presentes en los tratamientos de *T. viride* (CP4) en ausencia y presencia de naftaleno y fenantreno.

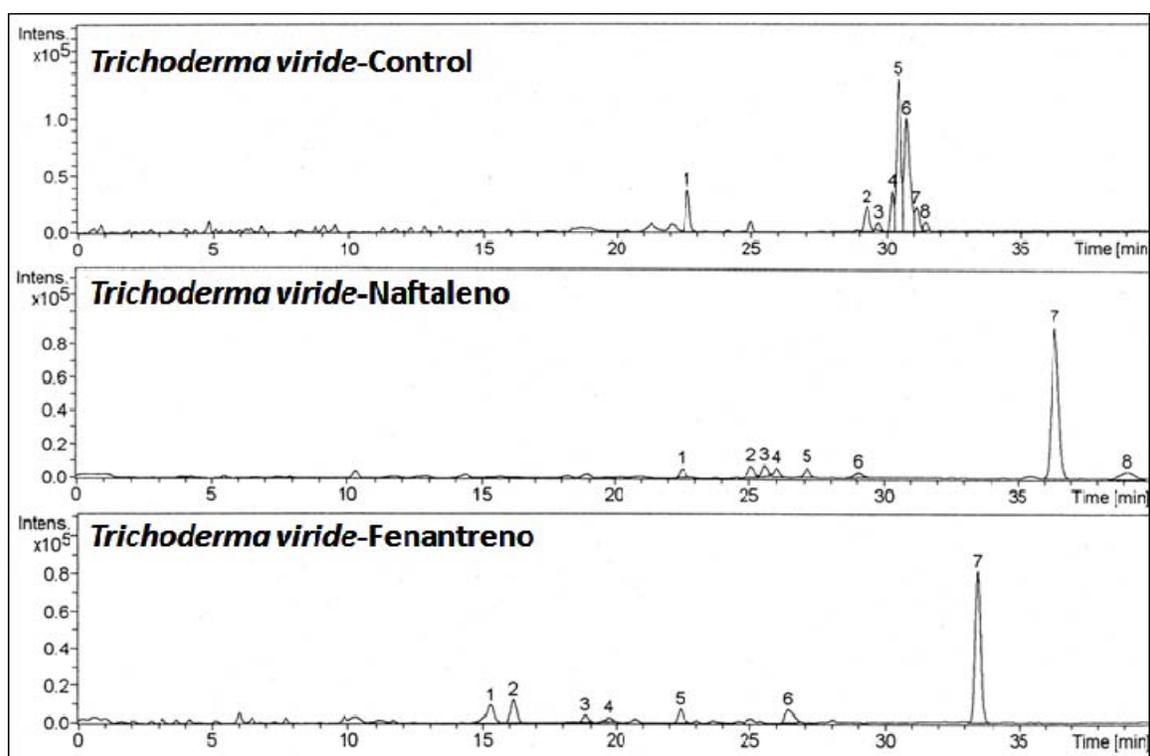


Figura 6.8. Cromatogramas del medio de cultivo extraído con metanol y liofilizado, correspondiente al cultivo de *Trichoderma viride* en presencia de naftaleno y fenantreno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

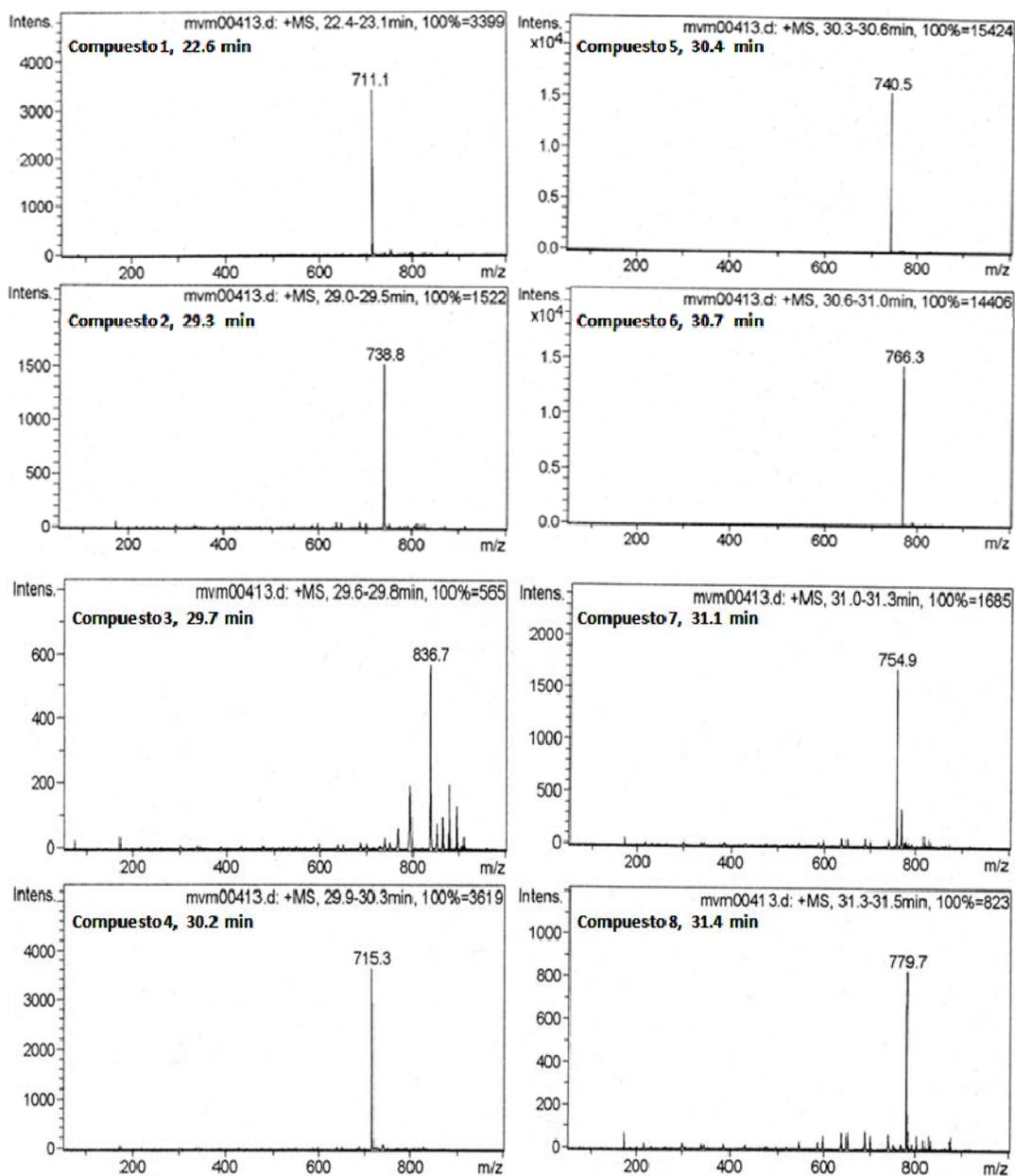
Trichoderma viride-Control

Figura 6.9. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol, correspondiente al control de *Trichoderma viride* a las 144 h de incubación.

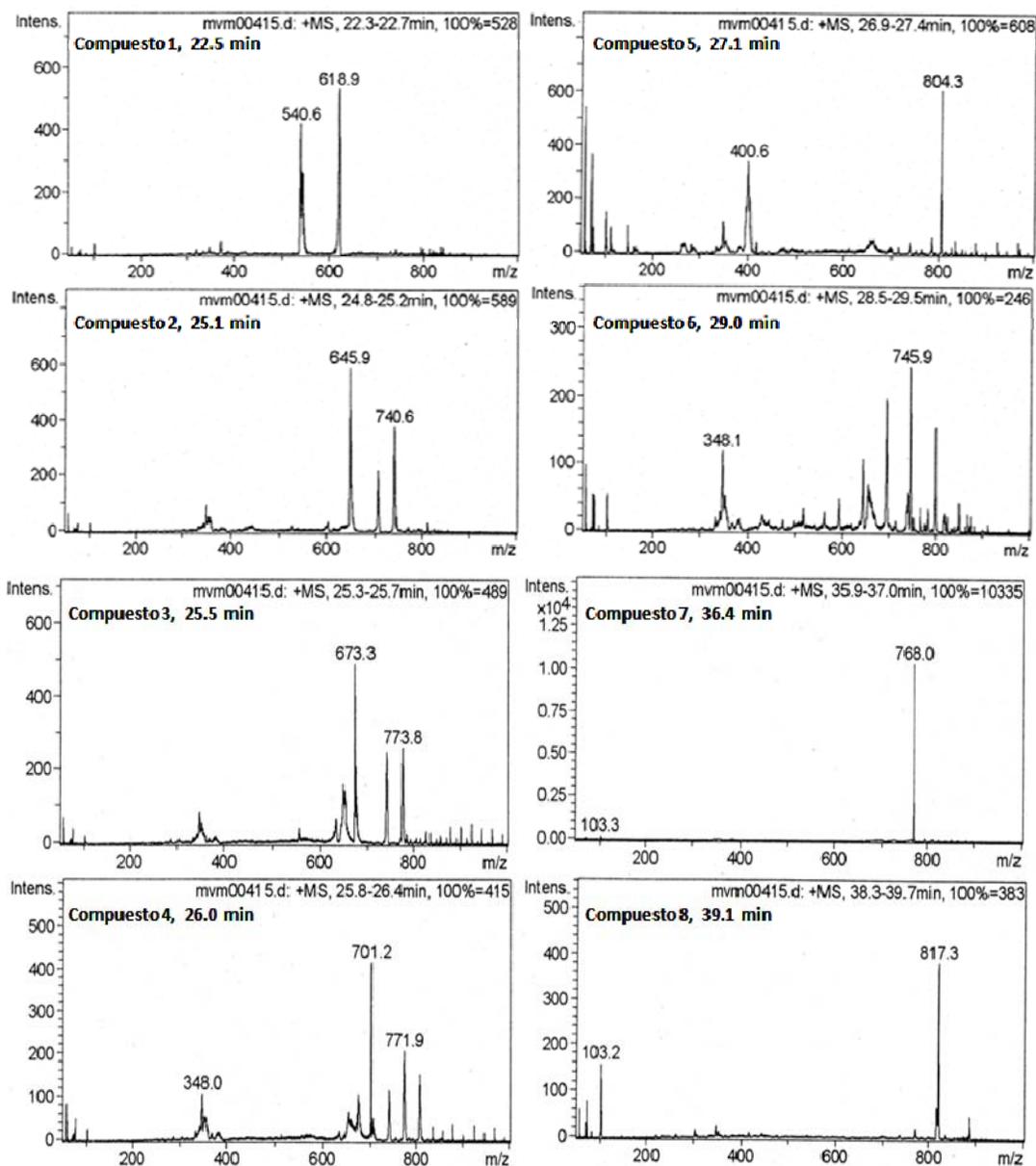
Trichoderma viride-Naftaleno

Figura 6.10. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol, correspondiente al cultivo de *Trichoderma viride* en presencia de naftaleno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

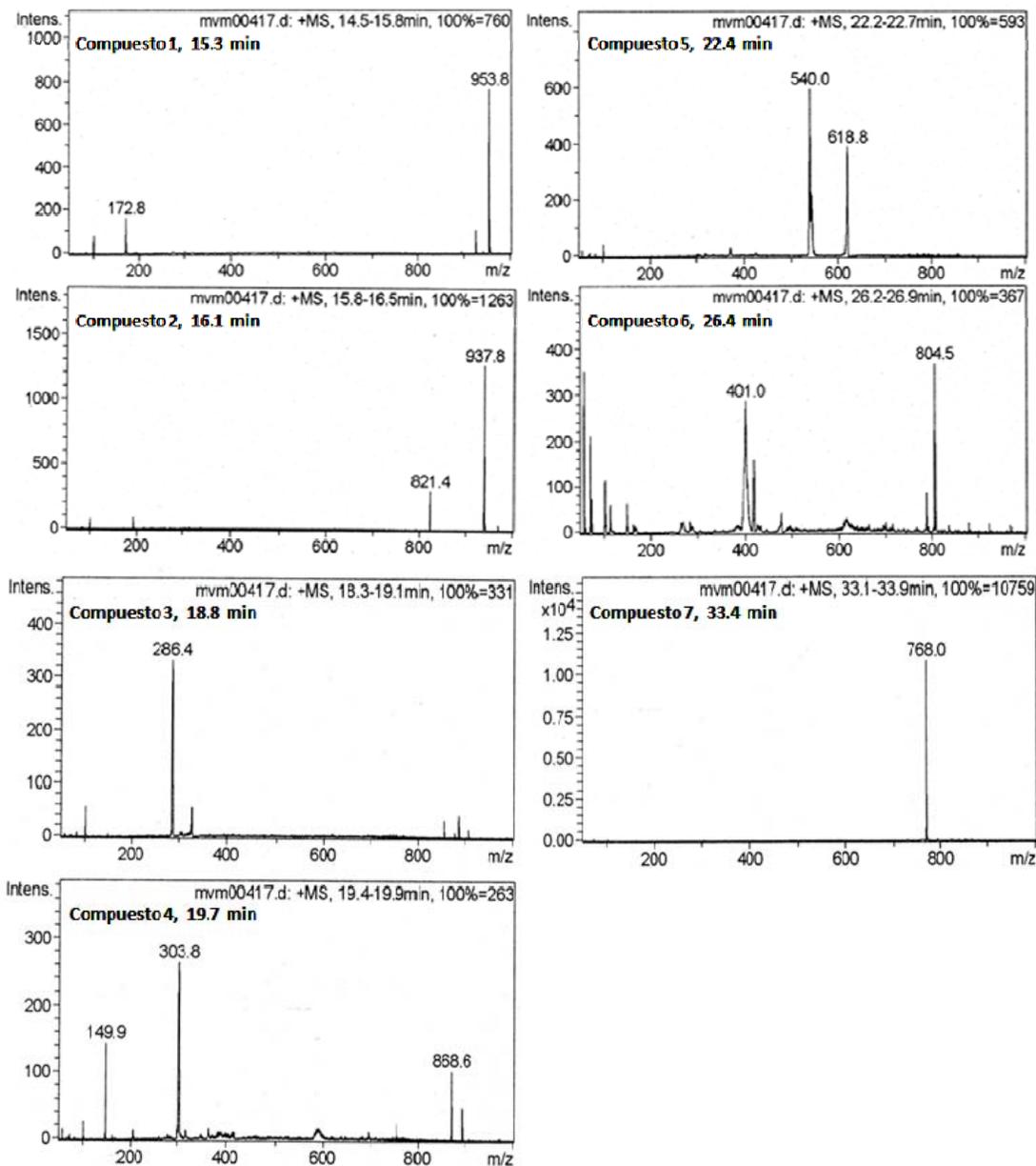
Trichoderma viride-Fenantreno

Figura 6.11. Patrones de fragmentación de los compuestos obtenidos del medio de cultivo liofilizado y extraído con metanol, correspondiente al cultivo de *Trichoderma viride* en presencia de fenantreno (100 mg L^{-1}), a las 144 h de incubación.

La presencia de naftaleno y/o fenantreno en el medio de cultivo donde creció *T. virens* no produjo cambios drásticos en la producción de los metabolitos en comparación con los obtenidos con su correspondiente control. El efecto observado se presentó solamente en la proporción de cada uno estos compuestos por la presencia de cualquiera de los dos HPA. No obstante, los hidrocarburos poliaromáticos produjeron cambios en la producción de metabolitos secundarios secretados al medio de cultivo donde creció *T. viride*. Además, los disolventes utilizados permitieron la extracción de diferentes compuestos a partir del liofilizado del medio de cultivo donde creció *T. viride*.

El presente trabajo es innovador y original, ya que no hay información con la que se puedan comparar los resultados obtenidos. Sin embargo, al mismo tiempo, da pauta a que se siga investigando sobre esta línea de investigación con el fin de identificar a cada uno de los metabolitos encontrados de acuerdo a su tiempo de retención, y definir con ello, su posible función en la detoxificación de hidrocarburos poliaromáticos.

A pesar de que ambas cepas utilizadas son especies del género *Trichoderma*, no se encontraron similitudes en sus patrones cromatográficos, por lo que éstos también podrían ser utilizados para diferenciar estas cepas. Lo anterior, es fortalecido por Thrane *et al.* (2001) quienes han propuesto el uso de patrones cromatográficos de HPLC para identificar especies del género *Trichoderma*.

6.4. CONCLUSIONES

La presencia de hidrocarburos poliaromáticos en el medio de cultivo donde crecen especies del género *Trichoderma* afecta la producción de metabolitos secundarios. El efecto de naftaleno y fenantreno sobre el metabolismo secundario al parecer depende de la especie fúngica, del medio de cultivo y la estrategia de supervivencia del hongo, como se observa en los resultados de esta investigación.

CAPÍTULO VII

IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P-450 EN *Trichoderma virens* Y *Trichoderma viride* EXPUESTAS A NAFTALENO, FENANTRENO Y BENZO[a]PIRENO

RESUMEN

El citocromo P450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de compuestos xenobióticos, y considera una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies desde bacterias a mamíferos, y de la cual se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. El citocromo P450 participa en múltiples funciones biosintéticas, en los hongos se encarga de la síntesis de esteroides de membrana y micotoxinas. La participación de citocromo P450, en la bioconversión de hidrocarburos poliaromáticos (HPA), se ha encontrado en hongos filamentosos como *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus pulmonarius*. Sin embargo, se desconoce si el sistema P450 está presente y participando en la detoxificación y la degradación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) por especies del género *Trichoderma*. Con base en lo anterior, el presente trabajo evaluó la expresión del citocromo P450 en dos cepas fúngicas del género *Trichoderma* cuando son expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno. La expresión de citocromo P450 se encontró únicamente en *Trichoderma virens* (CP1), y fue afectada por el tiempo de evaluación, concentración y tipo de HPA. Con esta información se infiere que el sistema citocromo P450 está involucrado en la detoxificación de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno por *Trichoderma virens*.

Palabras clave: *Trichoderma*, citocromo P450, hidrocarburos poliaromáticos

CHAPTER VII
IDENTIFICATION OF CYTOCHROME P450 IN *Trichoderma virens*
AND *Trichoderma viride* EXPOSED TO NAPHTHALENE,
PHENANTHRENE AND BENZO[*a*]PYRENE

ABSTRACT

The cytochrome P450 is the main responsible during the oxidative metabolism of xenobiotic compounds, it forms part of a hemoprotein family that is present in many species from bacteria to mammals, and for which more than 2000 different isoforms have been identified. The cytochrome P450 participates in multiple biosynthetic functions, for instance, in fungi, is responsible for the synthesis of membrane sterols, and also of mycotoxins. The contribution of the cytochrome P450 on the bioconversion of polyaromatic hydrocarbons (PAH) has been reported for filamentous fungi such as *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus pulmonarius*. However, it is still unknown if this P450 system is expressed during the detoxification and/or degradation of PAH by *Trichoderma* species. Thus, the present work evaluated the expression of the cytochrome P450 in two *Trichoderma* strains facing the presence of naphthalene, phenanthrene or benzo[*a*]pyrene. The expression of the cytochrome P450 was only found in the isolate *Trichoderma virens* (CP1), and it was affected by the time exposure, and concentration and type of the PAH. Results allow concluding that the cytochrome P450 system is involved in the detoxification of naphthalene, phenanthrene or benzo[*a*]pyrene by *Trichoderma virens*.

Key words: *Trichoderma*, cytochrome P450, polyaromatic hydrocarbons

7.1. INTRODUCCIÓN

El citocromo P450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. No se trata de una enzima, sino de una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, de la cual se han identificado más de 2000 isoformas diferentes (Omura y Sato, 1964; Omura, 1999). Todas las enzimas P450 conocidas se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud de sus secuencias de ADN que las codifica. Las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de las familias intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos (Okey, 1990).

El sistema enzimático P450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja en la amplia variedad de reacciones que puede catalizar, interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, aunque también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis (Gotoh, 1992; Graham y Peterson, 1999). Entre las reacciones catalizadas por el citocromo P450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones (Williams *et al.*, 2000; Werck-Reichhart y Feyereisen, 2001). Los citocromos P450 se clasifican en cuatro clases (I a la IV), en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico de la enzima. Las proteínas de la clase I utilizan una reductasa que contiene FAD y una ferrosulfoproteína (ferredoxina). Las proteínas de la clase II usan una cadena de transferencia de electrones más corta y sólo necesitan una reductasa del citocromo P450 que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones. Las proteínas de la clase III son autosuficientes y no requieren un donador de electrones,

mientras que las proteínas de la clase IV reciben los electrones directamente del NADPH (Sariaslani, 1991).

En organismos eucariotas los citocromos P450 de la clase I se encuentran asociados a la membrana interna de la mitocondria. Los citocromos P450 mitocondriales de la clase I identificados en diferentes especies de animales (estas enzimas no han sido descritos en plantas), parecen no estar relacionados con los citocromos P450 de clase I de organismos procariotas (Chapple, 1998; Waxman *et al.*, 1999; Honkakoski y Negishi, 2000; Kent *et al.*, 2001).

El citocromo P450 participa en múltiples funciones biosintéticas, en los hongos se encarga de la síntesis de esteroides de membrana y micotoxinas; en las plantas interviene en los procesos de síntesis y catabolismo de hormonas, en la oxidación de ácidos grasos, en las rutas metabólicas que conducen a la lignificación y en la síntesis de pigmentos y compuestos de defensa. En los animales, sus funciones incluyen la biosíntesis y el catabolismo de moléculas señalizadoras, hormonas esteroideas y ácido retinoico (Simpson, 1997; Chapple, 1998; Ioannides, 1999; Schlichting *et al.*, 2000; Nelson, 2003).

La participación del sistema enzimático P450, en la bioconversión de HPA, se ha encontrado en hongos filamentosos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius* (Masaphy *et al.*, 1995; Masaphy *et al.*, 1996; Doddapaneni *et al.*, 2005). Sin embargo, es desconocido, si el sistema P450 esta presente y participando en la degradación de HPA por especies del género *Trichoderma*. Tomando en consideración esta información, el presente trabajo evaluó la expresión del citocromo P450 en dos cepas fúngicas del género *Trichoderma* cuando son expuestas a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Preparación del inóculo

Para los ensayos se emplearon *Trichoderma virens* y *Trichoderma viride*, además de *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*, que se utilizaron como negativos para la identificación de citocromo P450 en las dos especies de *Trichoderma*. Las dos cepas de *Trichoderma*, *C. elegans* y *P. chrysosporium* se crecieron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA Baker®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron de la suspensión por filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10^6 esporas mL^{-1} .

7.2.2. Condiciones del cultivo

A frascos de vidrio de 150 mL de capacidad, se adicionaron 50 mL del medio mineral (g L^{-1}) 0.1 CaCl_2 ; 0.2 KCl ; 0.5 KH_2PO_4 ; 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.05 CuSO_4 ; 0.05 ZnSO_4 ; 0.43 MnSO_4 ; 0.05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$; 6 glucosa, pH 5.5. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la suspensión de esporas (10^6 esporas mL^{-1}) de las dos cepas de *Trichoderma* seleccionadas, *C. elegans* y *P. chrysosporium* al medio de cultivo correspondiente. Después los tratamientos fueron incubados a 28 ± 2 °C a 150 rpm por dos días. Previamente se prepararon soluciones madre de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno a 20,000 mg L^{-1} disueltas en CH_2Cl_2 . De cada una de estas soluciones se tomaron 250 y 500 μL , que se adicionaron a los medios de cultivo correspondientes al terminar el tiempo de incubación mencionado; para tener una concentración final de 100

y 200 mg L⁻¹ de cada uno de los hidrocarburos poliaromáticos. Después, cada uno de los tratamientos fue incubado una vez más a 28 ± 2 °C a 150 rpm por dos días, y se hicieron dos muestreos cada 24 h, para detectar la expresión del citocromo P450.

7.2.3. Extracción de ADN y corrimiento de PCR

De los cultivos crecidos de *T. virens*, *T. viride*, *C. elegans* y *P. chrysosporium* en medio líquido, se extrajo biomasa fúngica a las 48 h de incubación para la extracción de ADN de acuerdo con el procedimiento de González-Mendoza *et al.* (2010). El ADN fue cuantificado a partir de una dilución 1: 100 (5 µL de ADN más 500 µL de agua destilada estéril). La mezcla se colocó en una celda de cuarzo para espectrofotómetro (Thermo Scientific® Mod. Biomate 3) y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN se determinó obteniendo la relación entre las absorbancias a las longitudes de onda de 280 / 260 tomadas en el espectrofotómetro (Thermo Scientific® Mod. Biomate 3), y la calidad del ADN se estimó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

La reacción de PCR se preparó con un volumen de 30 µL, y la mezcla de reacción consistió de 18.1 µL de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril, 3 µL de amortiguador 10X, 2.5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL dNTP 10 mM, 1.6 µL de cada iniciador, 0.2 µL de ADN polimerasa de 500 unidades (Platinum®, Invitrogen) y 2 µL de ADN a una concentración de 20 ng µL⁻¹. Se utilizaron los iniciadores para citocromo P-450 **1F2for** (5'- CACCAGATTCTTGTTGATGC-3') y **1F2rev** (5'- GTCTCTTTCTACTCATTACC-3'), diseñados por Mukherjee *et al.* (2006) para identificar al citocromo P450 en *Trichoderma virens*. El programa de PCR se inició con

una predesnaturalización a 95 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C; con una extensión a 72 °C por 7 min. La amplificación se realizó en un termociclador automático (Labnet International®, Mod. Multigene). Los productos de PCR amplificados se depositaron en geles de agarosa al 1.0 %. El gel con los productos de PCR se visualizaron en un transiluminador Benchtop Variable Transilluminator®, y se analizaron con el programa Quantity One 4.0.3.

7.2.4. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

El ADN de las cepas fúngicas, obtenido de los productos de PCR con los iniciadores para citocromo P450 **1F2for** (5'- CACCAGATTCTTGTTGATGC-3') y **1F2rev** (5'-GTCTCTTTCTACACTCATTACC-3'), se limpió con la técnica de purificación fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). Los productos purificados (40 ng) se enviaron a secuenciar al CINVESTAV-Irapuato. Las secuencias obtenidas se analizaron en la base de datos GenBank con el paquete BLAST (<http://WWW.INCB.BLAST>).

7.2.5. Extracción de RNA, conversión a cDNA y PCR

La extracción de RNA de las cepas de *Trichoderma* se hizo de acuerdo al procedimiento descrito por Argumedo-Delira *et al.* (2008). Para convertir en cDNA el RNA libre de DNA, se colocaron 8 µL de la muestra en un tubo de 1.5 mL, y se adicionaron 2 µL de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril, 1 µL de dNTP (10 mM) y 1 µL de random primers, luego se incubó a 65 °C por 5 minutos. Posteriormente se preparó la siguiente mezcla con 4 µL de 5X first-strain reagent, 2 µL de DTT (0.1 mM) y

1 μL de RT-transcriptasa. A cada tubo se le adicionó 7 μL de la mezcla previamente descrita, y se puso a incubar a 42 °C por 50 min y a 72 °C por 15 min.

La reacción de PCR se preparó con un volumen de 30 μL , cuya mezcla de reacción consistió de 18.1 μL de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril, 3 μL de amortiguador 10X, 2.5 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL dNTP 10 mM, 1.6 μL de cada iniciador, 0.2 μL de ADN polimerasa de 500 unidades (Platinum®, Invitrogen) y 2 μL de cDNA. Se utilizaron los iniciadores para citocromo P450 **1F2for** (5'-CACCAGATTCTTGTTGATGC-3') y **1F2rev** (5'-GTCTCTTTCTACACTCATTACC-3'), diseñados por Mukherjee *et al.* (2006). El programa de PCR se inició con una predesnaturalización a 95 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C; con una extensión a 72 °C por 7 min. La amplificación se realizó en un termociclador automático (Labnet International®, Mod. Multigene). Los productos de PCR amplificados se depositaron en geles de agarosa al 1.0 %. El gel con los productos de PCR se visualizaron en un transiluminador Benchtop Variable Transilluminator® y se analizaron con el programa Quantity One 4.0.3.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Extracción de ADN y PCR

El ADN fue extraído de *Trichoderma virens* (CP1), *Trichoderma viride* (CP4), *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* con base en la técnica de González-Mendoza *et al.* (2010) como se muestra en la Figura 7.1. Se hizo una reacción de PCR con los iniciadores para citocromo P450 **1F2for** (5'-CACCAGATTCTTGTTGATGC-3') y **1F2rev** (5'-GTCTCTTTCTACACTCATTACC-

3') empleando como templete el ADN extraído de los hongos, para probar que el citocromo P450 se encuentra de forma constitutiva en los 4 hongos empleados. Como resultado, únicamente *Trichoderma virens* amplificó una región conservada de aproximadamente 300 pares de bases con estos iniciadores (**Fig. 7.2**).

La amplificación del ADN de *Trichoderma virens* fue purificada con el método de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001) y enviada a secuenciar para confirmar la presencia del citocromo P-450. Las secuencias obtenidas (**Fig. 7.3**) mostraron que pertenecían al citocromo P-450 de *Hypocrea virens* (Vir3) mRNA (con el número de acceso DQ456843.1 del Gen bank).

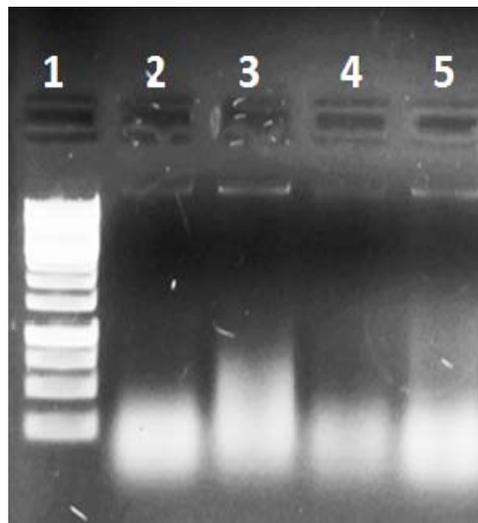


Figura 7.1. DNA de los hongos probados Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) DNA de *Trichoderma virens*, Carril 3) DNA de *Trichoderma viride*, Carril 4) DNA de *Cunninghamella elegans*, Carril 5) DNA de *Phanerochaete chrysosporium*. Gel de agarosa al 1.0 %.

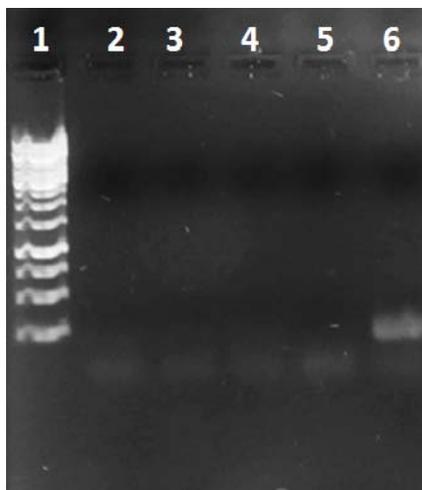


Figura 7.2. Productos de PCR de los cuatro hongos probados, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) amplificación del negativo (H₂O), Carril 3) amplificación de *Cunninghamella elegans*, Carril 4) amplificación de *Phanerochaete chrysosporium*, Carril 5) amplificación de *Trichoderma viride* y Carril 6) amplificación de *Trichoderma virens*. Gel de agarosa al 1.0 %.

Hypocrea virens 1 TGGCGTATAC GAGAGACTGC TTTTGGGCG AAGCTTACGA GATAGCCCGG GCATTCGAG 59
Hypocrea virens 5 CCACCTCTTA TTGTCTGCCA GCACCTTGAC TCGAATGCCN GGGNTRKCTC GAGAAGCTTC 64

Figura 7.3. Secuencias de nucleótidos conservados para el citocromo P450 en *Hypocrea virens*, donde se encuentran el iniciador reverso y el iniciador hacia delante.

La concentración letal de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno, que causó la muerte del 50% de la población de *Trichoderma virens* (LC₅₀) fue de 150 mg L⁻¹ (ensayos preliminares). Para determinar la presencia de citocromo P450 en cultivos de *Trichoderma virens* contaminados con naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno, se usó una concentración arriba y debajo de su LC₅₀, además se evaluó a las 24 y 48 h con la finalidad de determinar la expresión de citocromo P450 bajo estas condiciones.

7.3.2. Extracción de RNA, conversión a cDNA y PCR

Para detectar la expresión del citocromo P450 bajo estas condiciones, se extrajo el RNA de cada uno de los tratamientos a los que se expuso la cepa de *Trichoderma virens* de acuerdo con el procedimiento descrito por Argumedo-Delira *et al.* (2008), se transformó a cDNA y se hizo el corrimiento de PCR empleando los iniciadores **1F2for** y **1F2rev**. A las 24 h de evaluación se observó la expresión del citocromo P450 en *T. virens* en presencia de 100 mg L⁻¹ de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno (**Fig. 7.4**). Considerando este resultado, se evaluó la expresión del citocromo P450 en *T. virens* bajo dos concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno, una concentración debajo y otra concentración arriba de su LC₅₀ (100 y 200 mg L⁻¹); además se evaluó a las 24 y 48 h (**Fig 7.5 y 7.6**).

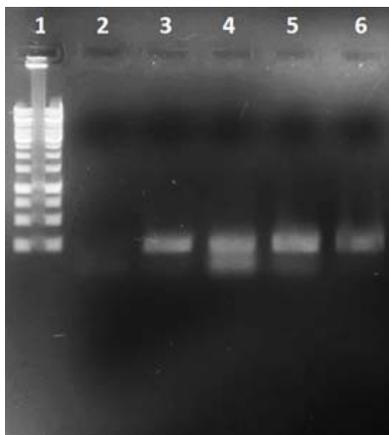


Figura 7.4. Productos de PCR de *Trichoderma virens* expuesta a hidrocarburos poliaromáticos (100 mg L⁻¹) a las 24 h, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) amplificación del negativo (H₂O), Carril 3) amplificación de *T. virens* (control), Carril 4) amplificación de *T. virens* expuesta a naftaleno, Carril 5) amplificación de *T. virens* expuesta a fenantreno, y Carril 6) amplificación de *T. virens* expuesta a benzo[*a*]pireno. Gel de agarosa al 1.0 %.

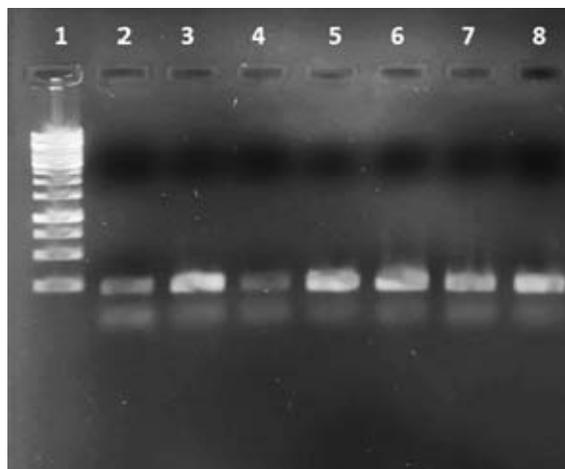


Figura 7.5. Productos de PCR de *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos a las 24 h de crecimiento, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) *T. virens* (control), Carril 3) *T. virens* expuesta a naftaleno (100 mg L⁻¹), Carril 4) *T. virens* expuesta a fenantreno (100 mg L⁻¹), Carril 5) *T. virens* expuesta a benzo[a]pireno (100 mg L⁻¹), Carril 6) *T. virens* expuesta a naftaleno (200 mg L⁻¹), Carril 7) *T. virens* expuesta a fenantreno (200 mg L⁻¹) y Carril 8) *T. virens* expuesta a benzo[a]pireno (200 mg L⁻¹) . Gel de agarosa al 1.0 %.

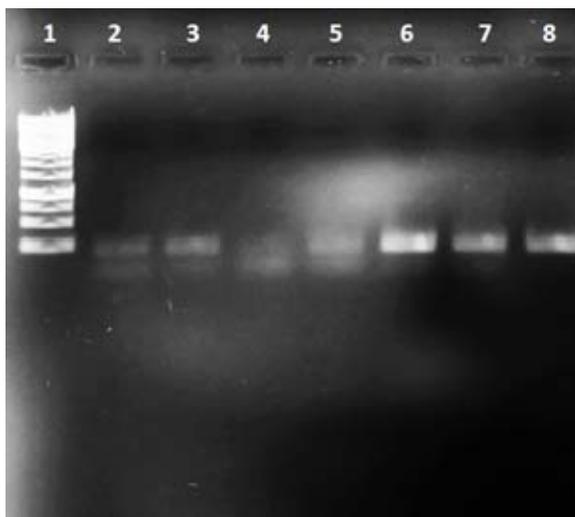


Figura 7.6. Productos de PCR de *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos a las 48 h de crecimiento, utilizando los iniciadores 1F2for y 1F2rev. Carril 1) marcador 1 kb (Fermentas®), Carril 2) *T. virens* (control), Carril 3) *T. virens* expuesta a naftaleno (100 mg L⁻¹), Carril 4) *T. virens* expuesta a fenantreno (100 mg L⁻¹), Carril 5) *T. virens* expuesta a benzo[a]pireno (100 mg L⁻¹), Carril 6) *T. virens* expuesta a naftaleno (200 mg L⁻¹), Carril 7) *T. virens* expuesta a fenantreno (200 mg L⁻¹) y Carril 8) *T. virens* expuesta a benzo[a]pireno (200 mg L⁻¹) . Gel de agarosa al 1.0 %.

La expresión de citocromo P450 a las 24 y 48 h, para *T. virens* fue afectada por la concentración de los tres hidrocarburos poliaromáticos probados (**Figs. 7.5 y 7.6**). Para evaluar de una manera cuantitativa el efecto de los HPA sobre el citocromo P450 de *T. virens*, se hizo de una manera semicuantitativa empleando unidades relativas de expresión. La cepa fúngica expuesta a naftaleno y benzo[*a*]pireno (100 mg L⁻¹ y 200 mg L⁻¹) presentó un incremento en la expresión del citocromo P450 a las 24 h y 48 h, con respecto al control (**Fig. 7.7 y Fig 7.8**). Sin embargo, la expresión de citocromo P50 en los tratamientos con fenantreno fueron estadísticamente iguales a los del control, a excepción del tratamiento expuesto a la dosis más alta (200 mg L⁻¹) de fenantreno y evaluado a las 48 h. La dosis más alta y el tiempo de evaluación más largo incrementaron la expresión de citocromo P450 en *T. virens* (**Fig. 7.8**).

Los iniciadores utilizados solo amplificaron con la cepa fúngica CP1 (*Trichoderma virens*), los cuales fueron diseñados por Mukherjee *et al.* (2006) para *Trichoderma virens*. Lo anterior sugiere que estos iniciadores son específicos para esta especie en particular de *Trichoderma*, pues no amplificaron con la cepa CP4 (*Trichoderma viride*) utilizada en este estudio.

Además y de manera indirecta, se reafirma la identificación de la cepa fúngica CP1 como *Trichoderma virens*, previamente descrita en el Capítulo III. Es importante mencionar que estos iniciadores fueron diseñados para detectar la expresión del citocromo P450 en *Trichoderma virens* cuando fue expuesta a hongos patógenos y con ello, identificar la función que tiene el citocromo P450 en la síntesis de antibióticos (viridiol y viridin) (Mukherjee *et al.* 2006).

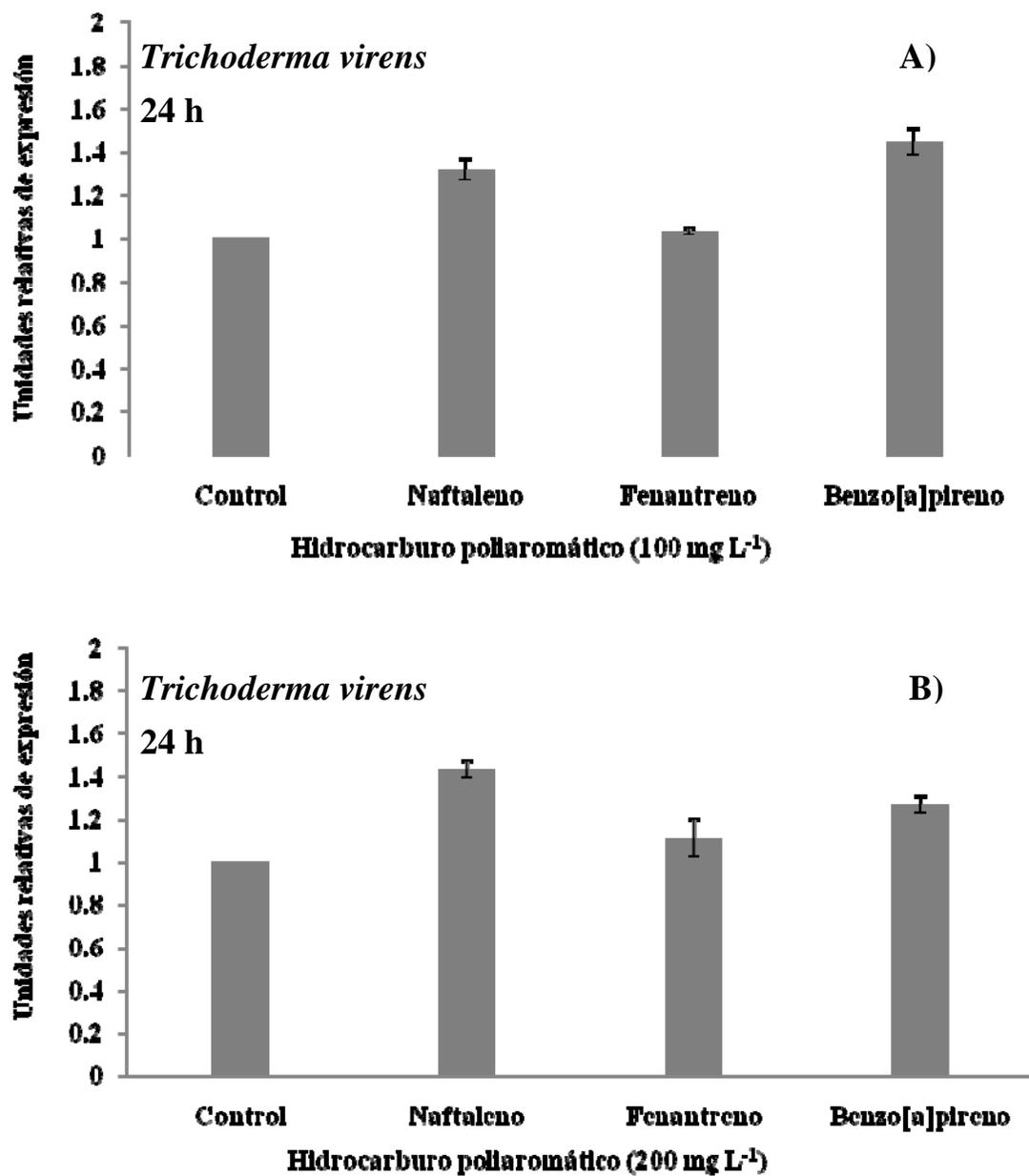


Figura 7.7. Unidades de expresión de citocromo P450 en *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno. A) cepa ante 100 mg L⁻¹ y B) cepa ante 200 mg L⁻¹, evaluada a las 24 h. (n=3, Media ± desviación estándar).

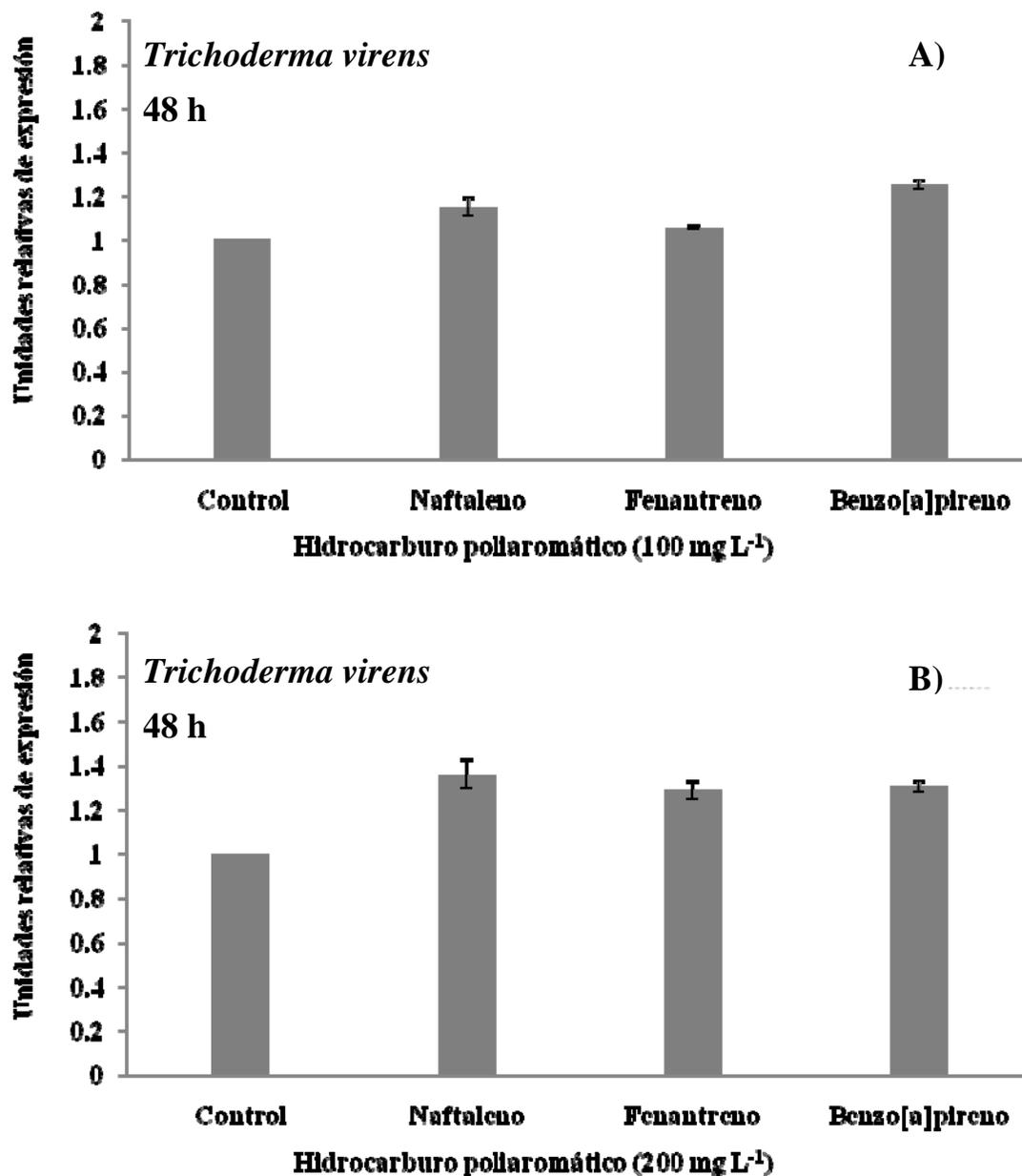


Figura 7.8. Unidades de expresión de citocromo P450 en *Trichoderma virens* expuesta a dos concentraciones de naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno. A) cepa ante 100 mg L⁻¹ y B) cepa ante 200 mg L⁻¹, evaluada a las 48 h. (n=3, Media ± desviación estándar).

En el presente estudio estos iniciadores se utilizaron para detectar la expresión del citocromo P450 en *Trichoderma virens* ante dos concentraciones de naftaleno, fenantreno y/o benzo[*a*]pireno, lo cual no había sido evaluado previamente en especies del género *Trichoderma*. En los hongos filamentosos ha sido difícil comprobar la participación directa del sistema enzimático P450 en la detoxificación o en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos (Sutherland, 1992; Cerniglia, 1993; Cerniglia, 1997); no obstante, se ha comprobado su participación de manera indirecta, empleando inhibidores específicos para citocromo P450 (Dutta *et al.*, 1983). Algunos hongos son capaces de utilizar sistemas enzimáticos alternativos, además del sistema enzimático P-450, para la detoxificación de HPA (Van den Brink *et al.*, 1998). Así, se han descrito enzimas ligninolíticas no específicas (lacasas, ligninasas y peroxidases) reportadas para los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Bjerkandera adusta*, los cuales pueden modificar el sustrato a través de la generación de radicales de oxígeno (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994; Schützendübel *et al.*, 1999; Pozdnyakova *et al.*, 2010). Bezalel *et al.* (1996) proponen que el sistema enzimático P450 y el sistema lignolítico están involucrados en la degradación de HPA. De acuerdo con lo postulado por Bezalel *et al.* (1997), el sistema enzimático P450 lleva a cabo la modificación inicial del anillo aromático, seguida de la degradación del derivado del HPA por el sistema lignolítico.

El complejo citocromo P450 fue identificado en la hidroxilación de benzo[*a*]pireno por *Phanerochaete chrysosporium* (Masaphy *et al.*, 1996). No obstante y de acuerdo con la búsqueda de literatura disponible, a la fecha no se ha reportado si el complejo citocromo P450 interviene en la detoxificación o en la degradación de HPA por especies del género *Trichoderma*. Los resultados del presente trabajo confirman que el

sistema citocromo P450 está involucrado de alguna manera en la detoxificación y degradación (información descrita en el Capítulo V) de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno en *Trichoderma virens*. A la vez, se observó que el tipo y concentración del hidrocarburo poliaromático, y el tiempo de evaluación, mostraron variaciones en la expresión del citocromo P450 en *Trichoderma virens*.

Los iniciadores utilizados para identificar el sistema citocromo P-450 fueron específicos para *Trichoderma virens*; sin embargo, se abre la posibilidad de hacer nuevos estudios donde se diseñen iniciadores para citocromo P-450 que puedan ser aplicados a todas las especies del género *Trichoderma*, y de esta forma conocer cómo interviene este sistema enzimático en la detoxificación y/o en la degradación de HPA.

7.4. CONCLUSIONES

El sistema citocromo P-450 esta involucrado en la detoxificación de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno por *Trichoderma virens*, y su expresión es estimulada principalmente, por el tipo y concentración del hidrocarburo poliaromático. Con los resultados obtenidos, se puede inferir la posible participación del citocromo P-450 en la detoxificación de HPA por otras especies del género *Trichoderma*.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DEL USO DE *TRICHODERMA* EN BIOTECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN

Los resultados de esta investigación sugieren que de las 11 cepas del género *Trichoderma* empleadas, 4 fueron altamente tolerantes (CP1, CP4, CP37 y CPX) a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno, característica que las hace ser candidatas para ser utilizadas en biotecnologías dirigidas para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos poliaromáticos. A pesar de que la degradación de las especies de *Trichoderma* probadas no fue tan alta (entre el 30-60%), ésta se encuentra dentro de los límites aceptables de degradación de hidrocarburos poliaromáticos con respecto a hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Pleurotus ostreatus* por mencionar algunos, ya que el tiempo de incubación fue muy corto, en comparación con otros estudios de biodegradación de este tipo de compuestos. Cabe mencionar que la degradación de HPA por *Trichoderma viride* (CP4) y *Trichoderma virens* (CP1) puede ser incrementada modificando las condiciones de cultivo. *Trichoderma viride* y *T. virens* utilizan como mecanismos de detoxificación de HPA, la acumulación de los compuestos en su micelio fúngico (8 y 3% para fenantreno y benzo[*a*]pireno respectivamente), así como la degradación de cada uno de los HPA evaluados. Además, se encontró la presencia del citocromo P-450 en *Trichoderma virens* cuando fue expuesta a naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno.

Con la información obtenida se generó un esquema general donde se describen los mecanismos involucrados en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos por *Trichoderma virens* (**Fig. 8.1**).

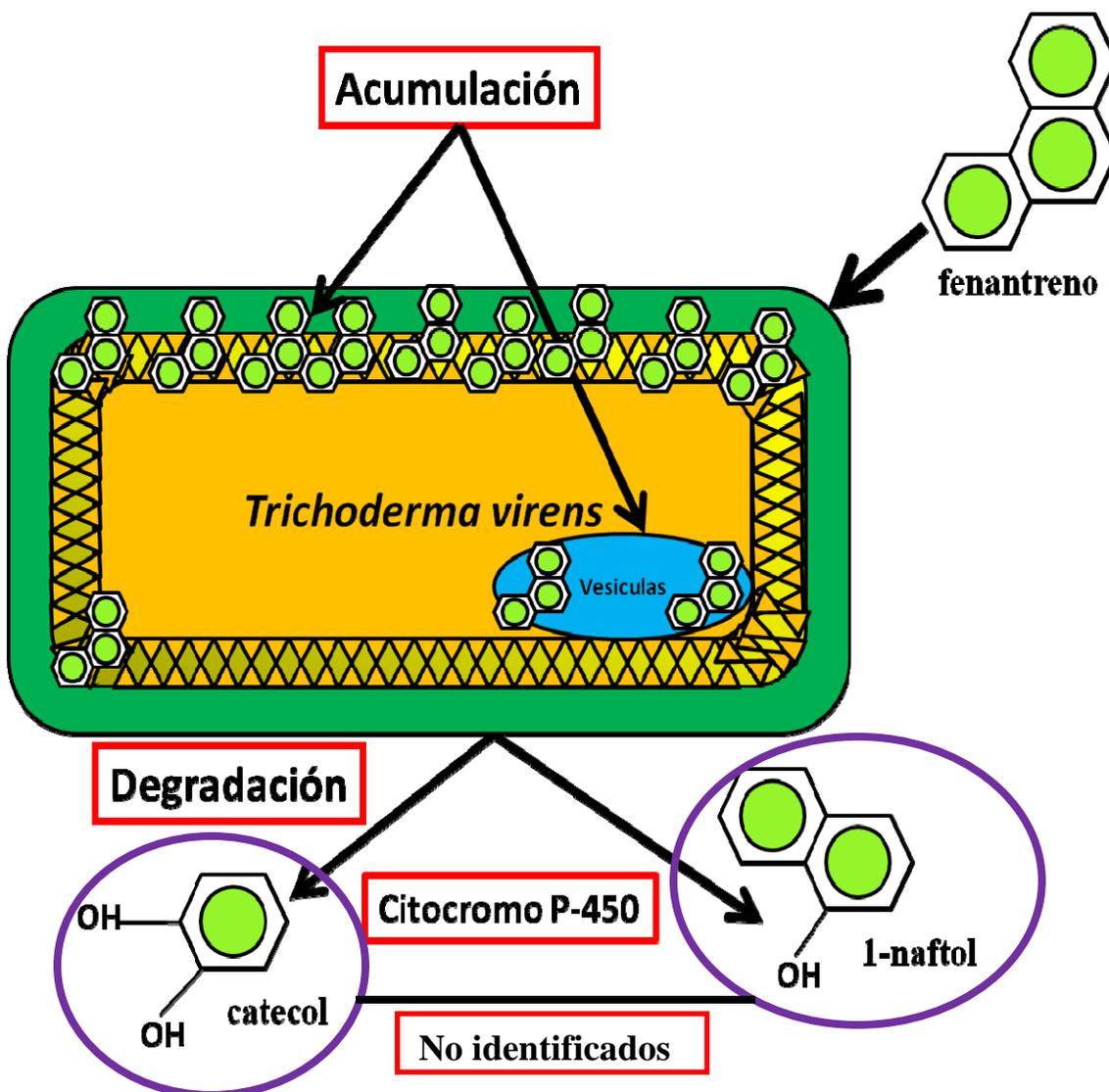


Figura 8.1. Mecanismos propuestos para la detoxificación de naftaleno fenantreno y benzo[*a*]pireno por *Trichoderma virens*, incluyendo la actividad del citocromo P-450 en la degradación de HPA.

Otra posible aplicación de las especies del género *Trichoderma* es como biofiltros de hidrocarburos poliaromáticos y de colorantes. Algunas de las especies utilizadas en esta investigación han sido probadas ante diferentes colorantes con buenos resultados (datos no publicados).

LITERATURA CITADA

- Abe, N., Murata, T., Hirota, A., 1998. Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62, 661-666.
- Adachi, T., Aoki, H., Osawa, T., Namiki, M., Yamane, T., Ashida, T., 1983. Structure of trichodermaol, antibacterial substance produced in combined culture of *Trichoderma* sp. with *Fusarium oxysporum* or *Fusarium solani*. *Chem Lett.* 6, 923-926.
- Ahmad, I., Malloch, D., 1995. Interaction of soil microflora with the bioherbicide phosphinothricin. *Agric Ecosyst Environ.* 54, 165-174.
- Akintokun, A.K., Akande, G.A., Akintokun, P.O., Popoola, T.O.S., Babalola, A.O., 2007. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *Int J Soil Sci.* 2, 301-307.
- Aksu, Z., 2003. Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 38, 1437-1444.
- Aksu, Z., Cagatay, S.S., 2006. Investigation of biosorption of gemazol turquoise blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Sep Purif Technol.* 48, 24-35.
- Aksu, Z., Kilic, N.K., Ertugrul, S., Donmez, G., 2007. Inhibitory effects of chromium(VI) and remazol black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol.* 40, 1167-1174.
- Alexander, M., 1981. Biodegradation of chemical of environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., 1979. *Introductory Mycology*. 3rded. New York: Willey.
- Alloway, B.J. 1995. Soil processes and the behavior of metals. En: *Heavy metals in soils*. (Alloway B. J., Ed.). Blackie A & P. London, UK.
- Amagata, T., Usami, Y., Minoura, K., Ito, T., Numata, A., 1998. Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: physico-chemical properties and structures. *J Antibiot.* 51, 33-40.
- Anand, P., Isar, J., Saran, S., Saxena, R.K., 2006. Biaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresour Technol.* 97, 1018-1025.

- Anderson, J.P., Domsch, K.H., 1976. Microbial degradation of the thiolcarbamate herbicide, diallate, in soils and pure culture of soil microorganisms. *Arch Environ Contam Toxicol.* 11, 1-7.
- April, T.M., Foght, J.M., Currah, R.S., 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol.* 46, 38-49.
- Argumedo-Delira, R., González-Mendoza, D., Alarcón, A., 2008. A rapid and versatile method for the isolation of total RNA from the filamentous fungus *Trichoderma* sp. *Ann Microbiol.* 58, 761-763.
- Armenante, P.M., Pal, N., Lewandowski, G., 1994. Role of mycelium and extracellular protein in the biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 60, 1711-1718.
- Arun, A., Praveen Raja, P., Arthi, R., Ananthi, M., Sathish Kumar, K., Eyini, M., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by Basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate. *Appl Biochem Biotechnol.* 151, 132-142.
- Atagana, H.I., 2009. Biodegradation of PAHs by fungi in contaminated-soil containing cadmium and nickel ions. *Afr J Biotechnol.* 21, 5780-5789.
- Augustiniak, H., Forche, E., Reichenbach, H., Wray, V., Graefe, U., Hoefle, G., 1991. Isolation and structure elucidation of ergokonin A and B; two new antifungal sterol antibiotics from *Trichoderma koningii*. *Liebigs Ann Chem.* 4, 361-366.
- Ávila-Miranda, M.E., Herrera-Estrella, A., Peña-Cabriales, J.J., 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biol Biochem.* 38, 1823-1830.
- Babich, H., Stotzky, G., 1985. Heavy metal toxicity to microbe mediated ecological processes: a review and potential application to regulatory policies. *Environ Res.* 36, 111-137.
- Barr, D.P., Aust, S.D., 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol.* 28, 78-87.
- Bayman, P., Radka, G.V., 1997. Transformation and tolerance of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 39, 45-53.

- BBSRC. 1999. A Joint Research Council Review of Bioremediation Research in the United Kingdom. Swindon: BBRRC, EPSRC y NERC.
- Berkeley, M. J. (1860). Oullines of British Fungology. Lovell Reeve, London. 24, 1-442.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol. 62, 292-295.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol. 63, 2495-2501.
- Binelli, A., Provini, A., 2004. Risk for human health of some POPs due to fish from Lake Iseo. Ecotoxicol Environ Saf. 58, 139-145.
- Bissett, J., 1984. A revisión of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can J Bot. 62, 924-931.
- Bissett, J., 1991a. A revisión of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can J Bot. 69, 2357-2372.
- Bissett, J., 1991 b. A revisión of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can J Bot. 69, 2372-2417.
- Bissett, J., 1991c. A revisión of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes of section *Longibrachiatum*. Can J Bot. 69, 2418-2420.
- Bissett, J., 1992. *Trichoderma atroviride*. Can J Bot. 70, 639-641.
- Bissett, J., Szakaacs, G., Nolan, C.N., Druzhinina, I., Gradinger, C., Kubicek, C.P., 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. Can J Bot. 81, 570-586.
- Bixby, M.W., Bousch, G.M., Matsumura, F., 1971. Degradation of dieldrin to carbon dioxide by soil fungus *Trichoderma Konigii*. Bull Environ Contam Toxicol. 64, 491-494.
- Bonnarme, P., Djian, A., Latrassé, A., Féron, G., Giniés, C., Durand, A., Le Querré, J.L., 1997. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. J Biotechnol. 56, 143-150.
- Boyle, C.D., Wiesner, C., Richardson, A., 1998. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. Soil Biol Biochem. 30, 873-882.

- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Brian, P.W., 1944. Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature.* 154, 667-668.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., 1991. *Biology of microorganisms*. Prentice Hall, London, pp. 874.
- Brombacher, C., Bachofen, R., Brandl, H., 1998. Development of a laboratory-scale leaching plant for metal extraction from fly ash by *Thiobacillus* strains. *Appl Environ Microbiol.* 64, 1237-1241.
- Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J., Viikari, J., 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40, 941-945.
- Bumpus, J.A., Aust, S.D., 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 53, 2001-2008.
- Bumpus, J.A., 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 55, 154-158.
- Calvo, A.M., Gardner, H.W., Keller, N.P., 2001. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* 276, 20766-20774.
- Cañizares-Villanueva, R.O., 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev Latinoam Microbiol.* 42, 131-143.
- Cerniglia, C.E., Yang, S.K., 1984. Stereoselective metabolism of anthracene y phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 47, 119-124.
- Cerniglia, C.E., White, G.L., Heflich, R.H., 1985. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Microbiol.* 143, 105-110.
- Cerniglia, C.E., Campbell, W.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., 1989. Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 55, 2275-2279.

- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Dodge, R.H., 1994. Metabolism of benz[*a*]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 60, 3931-3938.
- Cerniglia, C.E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 4, 331-338.
- Cerniglia, C.E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 19, 324-333.
- Chaîneau, C.H., Morelb, U.J., Duponta, J., Burya, E., Oudota, J., 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci Total Environ.* 227, 237-247.
- Champe, S.P., El-Zayat, A.A.E., 1989. Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol.* 171, 3982-3988.
- Chapple, C., 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P-450-dependent monooxygenases. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49, 311-343.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Overton, B.E., Samuels, G.J., 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophores elongations and green conidia. *Mycologia.* 95, 1100-1140.
- Chen, S., Liao, C., 2006. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Sci Total Environ.* 366, 112-123.
- Chiron, S., Fernandez-Alba, A., Rodriguez, A., Garcia-Calvo, E. 2000. Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art. *Water Res.* 34, 366-377.
- Chulalaksananukul, S., Gadd, G.M., Sangvanich, P., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Vangnai, A.S., 2006. Biodegradation of benzo[*a*]pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS Microbiol Lett.* 262, 99-106.
- Clausen, C.A., Smith, R.L., 1998. Removal of CCA from treated wood by oxalic acid extraction, steam explosion, and bacterial fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 20, 251-257.
- Cooke, W.B., 1968. Carbon/nitrogen relationships of fungus culture media. *Mycopathologia.* 34, 305-316.

- Coque, J.J.R., Alvarez-Rodriguez, M.L., Larriba, G., 2003. Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Appl Environ Microbiol.* 9, 5089-5095.
- Cserjesi, A.J., Jhonson, E.L., 1972. Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. *Can J Microbiol.* 18, 45-49.
- Danielson, R.M., Davey, C.B., 1973. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma* in vitro. *Soil Biol Biochem.* 5, 517-524.
- Das, A.C., Chakravarty, A., Sukul, P., Mukherjee, D., 2003. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere* 53, 1033-1037.
- Dave, H., Ramakrishna, C., Desai, J.D., 1996. Degradation of acrylic acid by fungi from petrochemical activated sludge. *Biotechnol Lett.* 18, 963-964.
- Deichmann, W.B., Henschler, D., Holmstedt, B., Keil, G., 1986. What is there that is not poison? A study of the third defense by Paracelsus. *Arch Toxicol.* 58, 207-213.
- Demain, A.L., Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 69, 1-39.
- Denissenko, M., Pao, A., Tang, M., 1996. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 274, 430-432.
- Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc.* 57, 41-48.
- Dhawale, S.W., Dhawale, S.S., Dean-Ross, D., 1992. Degradation of phenantrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3000-3006.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Harman, G.E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology.* 83, 308-313.
- Díaz, E., 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol.* 7:173-180.

- Díaz-Raviña, M., Baath, E., 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl Environ Microbiol.* 62, 2970-2977.
- Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B., Claydon, N., 1989. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1, 1885-1887.
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia.* 95, 27-40.
- Doddapaneni, H., Chakraborty, R., Yadav, J.S., 2005. Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering. *BMC Genomics.* 6, 1-24.
- Doi, Y., Abe, Y., Sugiyama, J., 1987. *Trichoderma* sect. *Saturnisporum*, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov. *Bull Nat Sci Museum, Ser B (Botany).* 12, 1-9.
- Drew, S.W., Demain, A.L., 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann Rev Microbiol.* 31, 343-356.
- Druzhinina, I., Kubicek, C.P., 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J Zhejiang.* 6B, 100-112.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P., 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience.* 47, 55-64.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28, 350-356.
- Durand, H., Clanet, M., Tiraby, G., 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme Microb Technol.* 10, 341-346.
- Dutta, D., Ghosh, D.K., Mishra, A.K., Samanta, T.B., 1983. Induction of a benzo[*a*]pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Evidence for multiple forms of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun.* 115, 692-699.
- Edwards, N.T., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment—A review. *J Environ Qual.* 12, 427-441.

- El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J., Buchenauer, H., 2009. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. *Eur J Plant Pathol.* 124, 457-470.
- Esposito, E., Da Silva, M., 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit Rev Microbiol.* 24, 89-98.
- Ezzi, M., Lynch, J.M., 2002. Cyanide catabolizing enzyme in *Trichoderma* spp. *Enzyme Microb Technol.* 31, 1042-1047.
- Ezzi, M., Lynch, J.M., 2003. Characterisation of the rhodanese enzyme in the *Trichoderma* spp. *Enzyme Microb Technol.* 32, 629-634.
- Ezzi, M., Lynch, J.M., 2005a. Plant microcosm studies demonstrating bioremediation of cyanide toxicity by *Trichoderma* and *Fusarium* spp. *Biol Fertil Soils.* 42, 40-44.
- Ezzi, M., Lynch, J.M., 2005b. Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme Microb Technol.* 36, 849-854.
- Fernando, T., Bumpus, J.A., Aust, S.D., 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 56, 1666-1671.
- Field, J.A., De Jong, E., Costa, G.F., De Bont., J.A.M., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl Environ Microbiol.* 58, 2219-2226.
- Field, J.A., De Jong, E., Costa, G.F., De Bont., J.A.M., 1993. Screening of ligninolytic fungi applicable to biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11, 44-49.
- Fradin, Z., Stein, G.Y., Varon, M., Kanter, P., Zeidman, A., 2005. Naphthalene induced fatal haemolysis in G6PD deficiency. *Haema.* 8, 283-285.
- Fu, Y., Viraraghavan, T., 2001. Fungal decolourization of dye wastewaters: a review. *Bioresour Technol.* 79, 251-262.
- Gadd, M.G., Ramsay, L., Crawford, J.W., Ritz, K., 2001. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. *Enzyme Microb Technol.* 204, 311-316.
- Gaete, H., Larrain, A., BaySchmith, E., Baeza, J., Rodríguez, J., 2000. Ecotoxicological assessment of two pulp mills effluents, locate in the Biobío river basin (Chile, Central). *Bull Environ Contam Toxicol.* 65, 183-189.

- Galante, Y.M., Monteverdi, R., Inama, S., Caldini, C., De Conti, A., Lavelli, V., Bonomi, F. 1993. New applications of enzymes in wine making and olive oil production. *Ital J Biochem.* 4, 34.
- Gams, W., Meyer, W., 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai?. *Mycologia.* 90, 904-915.
- Garo, E., Starks, C.M., Jensen, P.R., Fenical, W., Lobkovsky, E., Clardy, J., 2003. Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. *J Nat Prod.* 66, 423-426.
- Ghisalberti, E.L., Rowland, C.Y., 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod.* 56, 1799-1804.
- Gibson, D.T., 1991. Biodegradation, biotransformation and the Belmont. *J Ind Microbiol.* 12, 1-12.
- Goldfarb, J.L., Suuberg, E.M., 2008. Vapor pressures and enthalpies of sublimation of ten polycyclic aromatic hydrocarbons determined via the Knudsen effusion method. *J Chem Eng Data.* 53, 670-676.
- Gomez, I., Chet, I., Herrera-Estrella, A., 1997. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Mol Gen Genet.* 256, 127-135.
- González-Mendoza, D., Argumedo-Delira, R., Morales-Trejo, A., Pulido-Herrera, A., Cervantes-Díaz, L., Grimaldo-Juarez, O., Alarcón, A., 2010. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genet Mol Res.* 9, 162-166.
- Gotoh, O., 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) protein from comparative analysis of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem.* 267, 83-90.
- Graham, S.E., Peterson, J.A., 1999. How similar are P-450s and what can their differences teach us. *Arch Biochem Biophys.* 369, 24-29.
- Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K.-D., Th., Günther., Fritsche, W., 1999. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol Res.* 103, 1009-1018.

- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem.* 39, 1968-1977.
- Grey, R., Hofer, C., Schlosser, D., 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J Basic Microbiol.* 38, 371-382.
- Griffin, D.M., 1994. *Fungal Physiology*. Second Edition. Wiley-Liss, New York, pp. 485.
- Guarro, J., Pujol, I., Aguilar, C., Llop, C., Fernández-Ballart, J., 1994. Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 42, 385-387.
- Hadibarata, T., Tachibana, S., Ttoh, K., 2007. Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol Sci.* 10, 2535-2543.
- Hadibarata, T., Tachibana, S., 2009. Microbial degradation of *n*-eicosane by filamentous fungi. In: Obayashi, Y., Isobe, T., Subramanian, A., Suzuki, S., Tanabe, S. (Eds.), *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Environmental Research in Asia*, TERRAPUB, Tokyo, pp. 323-329.
- Hadibarata, T., Tachibana, S., 2009. Identification of phenanthrene metabolites produced by *Polyporus* sp. S133. In: Obayashi, Y., Isobe, T., Subramanian, A., Suzuki, S., Tanabe, S. (Eds.), *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Environmental Research in Asia*, TERRAPUB, Tokyo, pp. 293-299.
- Haggis, G.H., Michie, D., 1969. *Introducción a la biología molecular* (Pérez-Silva, J.). Alhambra, España, pp. 443.
- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Munch, J.C., Schloter, M., 2007. A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. *J Microbiol Meth.* 69, 86-92.
- Hammel, K.E., Gai, W.Z., Green, B., Moen, M.A., 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 58, 1832-1838.

- Harayama, S., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr Opin Biotechnol.* 8, 268-273.
- Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84, 377-393.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2, 43-56.
- Harris, G.H., Jones, E.T.T., Meinz, M.S., Nallin-Omstead, M., Helms, G.L., Bills, G.F., Zink, D., Wilson, K.E., 1993. Isolation and structure elucidation of viridiofungins A, B and C. *Tetrahedron Lett.* 34, 5235-5238.
- Harrison, H., Wearne, S., Gem, D.M., Gleadle, M.G., Starting, J., Thorpe, S., 1998. Time trends in human dietary exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs in the UK. *Chemosphere* 37, 1657-1670.
- Hay, A.G., FoCht, D.D., 1998. Cometabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane by *Pseudomonas acidovorans* M3GY grown on biphenyl. *Appl Environ Microbiol.* 64, 2141-2146.
- Hellwig, J., Gembardt, C.H.R., Murphy, S.R., 1997. Acrylic acid: two-generation reproduction toxicity study in wistar rats with continuous administration in the drinking water. *Food Chem Toxicol.* 35, 859-868.
- Helsen, L., van Den Bulck, E., 2005. Review of disposal technologies for chromated copper arsenate (CCA) treated wood waste, with detailed analyses of thermochemical conversion processes. *Environ Pollut.* 134, 301-314.
- Herbert, R.B., 1994. The biosynthesis of secondary metabolites Second Edition. Chapman and Hall, London, pp. 231.
- Honkakoski, P., Negishi, M., 2000. Regulation of cytochrome P-450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J.* 347, 321-37.
- Horvath, R.S., 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol Rev.* 36, 146-155.
- Hughes, K.A., Bridge, P., Clark, M.S., 2007. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Sci Total Environ.* 372, 539-548.

- Hundal, L.S., Singh, J., Bier, E.L., Shea, P.J., Comfort, S.D., Powers, W.L., 1997. Removal of TNT and RDX from water and soil using iron metal. *Environ Pollut.* 97, 55-59.
- Ibarra-Medina, V.A., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, M.E. Lara-Hernandez y J.M. Valdes-Carrasco. 2010. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Rev Mex Mic.* 31, 53-63.
- Ioannides, C., 1999. Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes P-450. *Xenobiotica.* 29, 109-154.
- Iqbal, M., Saeed, A., 2007. Biosorption of reactive dye by loofa sponge-immobilized fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 42, 1160-1164.
- Itävaara, M., Siika-aho, M., Viikari, L., 1999. Enzymatic degradation of cellulose-based materials. *J Polym Environ.* 7, 67-73.
- Jackson, A.M., Whipps, J.M., Lynch, J.M., 1991. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World J Microbiol Biotechnol.* 7, 494-501.
- Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.S., Druzhinina, I.S., 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud Mycol.* 55, 135-177.
- Jansson, J.K. 2003. Marker and reporter genes: Illuminating tools for environmental microbiologists. *Curr Opin Microbiol.* 6, 310-316.
- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *Int Biodet Biodegrad.* 45, 57-88.
- Kanally, R.A., Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* 182, 2059-2067.
- Kapdan, I.K., Kargia, F., McMullanb, G., Marchant, R., 2000. Effect of environmental conditions on biological decolourization of textile dyestuff by *C. versicolor*. *Enzyme MicrobTechnol.* 26, 381-387.

- Kartal, S.N., Larsen, M., Winandy, J.E., Highley, T.L., 1991. Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. *Mat Und Org.* 26, 191-213.
- Kartal, S.N., Muehl, J., 2001. Particleboard made from remediated CCA-treated-wood: Evaluation of panel properties. *Forest Prod J.* 51, 61-64.
- Kartal, S.N., Munir, E., Kakitani, T., Imamura, Y., 2004. Bioremediation of CCA-treated wood by brown-rot fungi *Fomitopsis palustris*, *Caniophora puteana* and *Laetiporus sulphureus*. *J of Wood Sci.* 50, 182-188.
- Kartal, S.N., Katsumata, N., Imamura, Y., 2006. Removal of copper, chromium, and arsenic from CCA-treated wood by organic acids released by mold and staining fungi. *Forest Prod J.* 56, 33-37.
- Kasai, Y., Kishira, H., Harayama, S., 2002. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Appl Environ Microbiol.* 68, 5625-5633.
- Katayama, A., Matsumura, F., 1993. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ Toxicol Chem.* 12, 1059-1065.
- Kaushik, P., Malik, A., 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environ Int.* 35, 127-141.
- Kavanagh, K., 2005. *Fungi: biology and applications*. John Wiley and Sons, England, pp. 267.
- Kawai, F., Zhang, D., Sugimoto, M., 2000. Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 189, 143-147.
- Kent, U.M., Juschyshyn, M.I., Hollenberg, P.F., 2001. Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P-450 structure and function. *Curr Drug Metab.* 2, 215-243.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuel, G.J., Kubicek, C.P., 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet Biol.* 24, 298-309.
- Kleifeld, O., Chet, I., 1992. *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil.* 144, 267-272.
- Knowles, C.J., Bunch, A.W., 1986. Microbial cyanide metabolism. *Adv Microb Physiol.* 27, 73-111.

- Kovacs, T.G., Gibbons, G.J.S., Tremblay, B.I., O'Connor, P.H., Voss, R.H., 1995. The effects of secondary treated bleached kraft mill effluent on aquatic organisms as assessed by short-term and long-term tests. *Ecotoxicol Environ Safety*. 31, 7-22.
- Krumholz, L.R., Li, J., Clarkson, W.W., Wilber, G.G., Suflita, J.M., 1997. Transformation of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron accepting conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 18, 161-169.
- Krzysko-Lupicka T., Stroff W., Kubs K., Skorupa M., Wieczorek P., Lejczak B., Kafarski, P., 1997. The ability of soil borne fungi to degrade organophosphate carbon-to-phosphorus bonds. *Appl Environ Microbiol*. 48, 549-552.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E.M., 1993. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb Technol*. 15, 90-99.
- Kubicek, C.P., Harman, G.E., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics. *Trends Microbiol*. 6, 459-460.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol*. 38, 310-319.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Meyer, W., Kubicek, C.P., Börner, T., 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*. 89, 442-460.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P., 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*-a multigene approach. *Mycol Res*. 106, 757-767.
- Kutz, F.W., Wood, P.H., Bottimore, D.P., 1991. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Rev Environ Contam Toxicol*. 120, 1-82.
- Lamar, R.T., Davis, J.W., Dietrich, D.M., Glaser, J.A., 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosotecontaminated soil using the lignin degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biol Biochem*. 26, 1603-1611.

- Lange, B., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H., 1994. Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: Identificación of trans-4,5-dihidro-4,5-dihidroxi pireno and 1-pyrenylsulfate in strain JK364. *Appl Environ Microbiol.* 60, 3602-3607.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 54, 305-315.
- Lestan, D., Lamar, R.T., 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol.* 62, 2045-2052.
- Li, X., Gan, Y., Yang, X., Zhou, J., Dai, J., Xu, M., 2008. Human health risk of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in edible fish from Huairou Reservoir and Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Food Chem.* 109, 348-354.
- Liao, C., Chiang, K., 2006. Probabilistic risk assessment for personal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Taiwanese temples. *Chemosphere.* 63, 1610-1619.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Nirenberg, H., Petrini, O., 1999. A Morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Appl Environ Microbiol.* 65, 2418-2428.
- Lokesha, S., Somashekar, R.K., 1989. Biosorption potency of heavy metals by some fungi. *Curr Sci.* 58, 571-573.
- López-Errasquín, E., Vázquez, C., 2003. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere* 50, 137-143.
- Lu, B.S., Druzhinina, I., Chaverri, P., Fallah, P., Gradinger, C., Kubicek, C.P., Samuels, G.J., 2004. *Hypocrea/Trichoderma* species with *pachybasium*-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum*, and their newly discovered relatives. *Mycologia.* 96, 310-342.
- Lynch, J.M., Wilson, K.L., Ousley, M.A., Whipps, J.M., 1991. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Lett Appl Microbiol.* 12, 59-61.
- Lynch, J.M., Moffat, A.J., 2005. Bioremediation -Prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann Appl Biol.* 146, 217-221.

- Maliszewska-Kordybach, B., 1999. Sources, concentrations, fate and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment. Part A: PAHs in air. *Pol J Environ Stud.* 8, 131-136.
- Manilal, V.B., Alexander, M., 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 35, 401-405.
- Martín Moreno, C., González Becerra, A., Blanco Santos, M.J., 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol.* 21, 103-120.
- Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S.L., 1995. Microsomal and cytosolic cytochrome P450-mediated benzo[*a*]pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*. *Biotechnol Lett.* 17, 969-974.
- Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S.L., 1996. Evidence for cytochrome P450 and P450-mediated benzo[*a*]pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett.* 135, 51-55.
- Matos, J.F.S., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., 2007. Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Lett Appl Microbiol.* 45, 270-275.
- Matsubara, M., Lynch, J.M., De Leij, F.A.A.M., 2006. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme Microb Technol.* 39, 1365-1372.
- Matsumura, F., Bousch, G.M., 1968. Degradation of insecticides by a soil fungus *Trichoderma viride*. *J Econ Entomol.* 61, 610-612.
- Meyer, R.J., Plaskowitz, J.S., 1989. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. *Mycologia.* 81, 312-317.
- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., Kämpfer, P., 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* 145, 1731-1741.
- Mishra, G., Tripathi, M., 1993. A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage.* 40, 35-38.

- Mitra, J., Raghu, K., 1998. Long term DDT pollution in tropical soils: effect of DDT and degradation products on soil microbial activities leading to soil fertility. *Bull Environ Contam Toxicol.* 60, 585-591.
- Moen, M. A., Hammel, K. E., 1994. Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl Environ Microbiol.* 60, 1956-1961.
- Mokeyev, A.N., Iljin, V.A., Gradova, N.B., 1998. Biotechnological degradation of the radioactive cellulose containing waste. *J Mol Catal B Enzym.* 5, 441-445.
- Montiel, A.M., Fernández, F.J., Marcial, J., Soriano, J., Barrios-González, J., Tomasini A., 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnol Lett.* 26, 1353-1357.
- Morales-Barrera, L., Cristiani-Urbina, E., 2006. Removal of hexavalent chromium by *Trichoderma viride* in an airlift bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 107-113.
- Morgan, P., Lewis, S.T., Watkinson, R.J., 1991. Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34, 693-696.
- Morley, G.F., Gadd, G.M., 1995. Sorption of toxic metal by fungi and clay minerals. *Mycol Res.* 99, 1429-1438.
- Mukherjee, I., Mittal, A., 2005. Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 75, 1034-1040.
- Mukherjee, M., Horwitz, B.A., Sherkhane, P.D., Hadar, R., Mukherjee, P.K., 2006. A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens*: evidence from analysis of genes underexpressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic production. *Curr Genet.* 50, 193-202.
- Nazly, N., Knowles, C.J., 1981. Cyanide degradation by immobilized fungi. *Biotechnol Lett.* 3, 363-368.
- Nelson, D.R., 2003. Comparison of P-450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P-450 evolution. *Arch Biochem Biophys.* 409, 18-24.

- Nikiforova, S.V., Pozdnyakova, N.N., Turkovskaya, O.V., 2009. Emulsifying agent production during PAHs degradation by the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus* D1. *Curr Microbiol.* 58, 554-558.
- Nwaogu, L.A., Onyeze, G.O.C., Nwabueze, R.N., 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *Afr J Biotechnol.* 12, 1939-1943.
- Oja, V., Suuberg, E.M., 1998. Vapor pressures and enthalpies of sublimation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *J Chem Eng Data.* 43, 486-492.
- Okey, A.B., 1990. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharm Ther.* 45, 241-298.
- Olsson, L., Christensen, T.M.I.E., Hansen, K.P., Palmqvist, E.A., 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol.* 33, 612-619.
- Omar, S.A., 1998. Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation.* 9, 327-336.
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomas. II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem.* 239, 2379-2385.
- Omura, T., 1999. Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun.* 266, 690-698.
- Ousley, M.A., Lynch, J.M., Whipps, J.M., 1994. Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biol Fertil Soils.* 17, 85-90.
- Palacios, G., Gómez, I., Mataix, J., Guerrero, C., 1989. Disponibilidad de níquel en un suelo fuertemente calcáreo y su incidencia sobre la solubilidad de calcio y magnesio. *Edafología.* 5, 129-134.
- Pahlmann, R., Pelkonen, O., 1987. Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structures. *Carcinogenesis* 8, 773-778.
- Palmer, W.G., Beaman, J.R., Walters, D.M., Creasia, D.A., 1997. Bioavailability of TNT residues in composts of TNT-contaminated soils. *J Toxicol Environ Health.* 51, 97-103.

- Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol.* 23, 23-54.
- Paszczyński, A., Crawford, R.L., 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Progr.* 11, 368-379.
- Patel, H., Gupte, A., Gupte, S., 2009. Biodegradation of fluoranthene by Basidiomycetes fungal isolate *Pleurotus Ostreatus* HP-1. *Appl Biochem Biotechnol.* 157, 367-376.
- Pazarlioglu, N.K., Urek, R.O., Ergun, F., 2005. Biodecolourization of direct blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 40, 1923-1929.
- Pečiulytė, D., 2007. Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija.* 53, 11-18.
- Persoon, C.H., 1794. *Dispositio methodica fungorum*. *Romer's neues Magazin Botanische*, 1, 81-128.
- Põldmaa, K., 2000. Generic delimitation of the fungicolous *Hypocreaceae*. *Stud Mycol.* 45, 83-94.
- Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E., 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3654-3659.
- Potin, O., Rafin, C., Veignie, E., 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int Biodeterior Biodegrad.* 54, 45-52.
- Pozdnyakova, N.N., Nikiforova, S.V., Makarov, O.E., Chernyshova, M.P., Pankin, K.E., Turkovskaya, O.V., 2010. Influence of cultivation conditions on pyrene degradation by the fungus *Pleurotus Ostreatus* D1. *World J Microbiol Biotechnol.* 26, 205-211.
- Pozdnyakova, N.N., Nikiforova, S.V., Turkovskaya, O.V., 2010. Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. *Cent Eur J Biol.* 5, 83-94.
- Qian-Cutrone, J., Huang, S., Chang, L.P., Pirnik, D.M., Klohr, S.E., Dalterio, R.A., Hugill, R., Lowe, S., Alam, M., Kadow, K.F., 1996. Harziphilone and flephilone,

- two new HIV REV/RRE binding inhibitors produced by *Trichoderma harzianum*.
J Antibiot. 49, 990-997.
- Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman R., 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. Chemosphere 40, 557-563.
- Raybuck, S.A., 1992. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. Biodegradation. 3, 3-18.
- Reese, E.T., Mandels, M., 1989. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. Annu Rep Ferment Proc. 7, 1-20.
- Rehner, S.A., Samuels, G.J., 1995. Molecular systematics of the *Hypocreales*: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. Can J Bot. 73, 5816-5823.
- Resnick, S.M., Lee, K., Gibson, D.T., 1996. Diverse reaction catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. J Ind Microbiol Biotechnol. 17, 438-457.
- Richards, D.J., Shieh, W.K., 1989. Anoxic-oxic activated sludge treatment of cyanides and phenols. Biotechnol Bioeng. 33, 32-38.
- Riddell, R.W., 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia. 42, 265-270.
- Rifai, M.A., 1969. A revision of genus *Trichoderma*. Mycol. Pap. 116, 1-56.
- Robidoux, P.I., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I., 1999. Acute toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia andrei*). Ecotoxicol Environ Saf. 44, 311-321.
- Rodríguez, E., Pickard, M., Vazquez-Duhalt, R., 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. Curr Microbiol. 38, 27-31.
- Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. Crop Prot. 26, 549-555.
- Ronne, H., 1995. Glucose repression in fungi. Trends Genet. 11, 12-17.
- Rossmann, A.Y., Samuels, G.J., Rogerson, C.T., Lowen, R., 1999. Genera of the *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). Stud Mycol. 42, 1-248.

- Sack, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F., Fritsche, W., 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl Environ Microbiol.* 63, 3919-3925.
- Sadhasivam, S., Savithaa, S., Swaminathana, K., 2007. Exploitation of *Trichoderma harzianum* mycelial waste for the removal of rhodamine 6G from aqueous solution. *J Environ Manage.* 85, 155-161.
- Sambrook, J., Rusell, D.W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 7.4-7.8.
- Samuels, G.J., 1996. *Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus.* *Mycol Res.* 100, 923-935.
- Samuels, G.J., 2005. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology.* 96, 195-206
- Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology.* *Phytopathology.* 96, 195-206.
- Samuels, G.J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Kubicek, C.P., 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud Mycol.* 41,1-54.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud Mycol.* 48, 1-116.
- Saraswathy, A., Hallberg, R., 2002. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiol Lett.* 210, 227-232.
- Sariaslani, F.S., 1991. Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism. *Adv Appl Microbiol.* 36, 133-177.
- SAS Institute Inc. 2002. *The SAS system for windows, ver. 9.0.* SAS Institute Inc, Cary, North Carolina.
- Sayler, G.S., Fleming, J.T., Nivens, D.E., 2001. Gene expression monitoring in soils by mRNA analysis and gene lux fusions. *Curr Opin Biotechnol.* 12, 455-460.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Mayes, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., Sligar, S.G., 2000. The catalytic pathway of cytochrome P-450cam at atomic resolution. *Science.* 287, 1615-1622.

- Schulein, M., 2000. Protein engineering of cellulases. *Biochim Biophys Acta.* 1543, 239-252.
- Schützendübel, A., Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A., 1999. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 43, 93-100.
- Score, A.J., Palfreyman, J.W., 1994. Biological control of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by *Trichoderma* spp.: The effects of complex and synthetic media on interaction and hyphal extension rates. *Int Biodeterior Biodegrad.* 33, 115-128.
- Serrano-Carreón, L., Balderas-Ruíz, K., Galindo, E., Rito-Palomares, M., 2002. Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58, 170-174.
- Shaheen, Z., Farrukh, A., Iqbal, A. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol.* 98, 2557-2561.
- Shannon, M.J.R., Unterman, K., 1993. Evaluating biorremediation: Distinguishing fact from fiction. *Annu Rev Microbiol.* 47, 715-738.
- Shiosaki, R.K., da Costa Albuquerque, C.D., Okada, K., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M., 2008. Monitoring the effect of pyrene on the germination and radial growth of the wild and mutant strains of *Rhizopus arrhizus* UCP402. *Braz arch biol technol.* 51, 613-621.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 59, 201-222.
- Silva, M., Umbuzeiro, G.A., Pfenning, L.H., Canhos, V.P., Esposito, E., 2003. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. *Soil Sediment Contam.* 12, 345-356.
- Simini, M., Wentzel, R.S., Checkai, R.T., Phillips, C.T., Chester, N.A., Major, M.A., Amos, J.C., 1995. Evaluation of soil toxicity at joliet army ammunition plant. *Environ Toxicol Chem.* 14, 623-630.

- Simpson, A.E., 1997. The cytochrome P-450 (CYP4) family. *Gen Pharmacol.* 28, 351-359.
- Singh, B.K., Walker, A., 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 30, 428-471.
- Singh, S.K., Sharma, V.P., Sharma, S.R., Kumar, S., Tiwari, M., 2006. Molecular characterization of *Trichoderma* taxa causing green mould disease in edible mushrooms. *Curr Sci India.* 90, 427-431.
- Skinner, K., Cuiffetti, L., Hyman, M., 2009. Metabolism and cometabolism of cyclic ethers by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl Environ Microbiol.* 75, 5514-5522.
- Smith, W.H., 1995. Forest occurrence of *Trichoderma* species: Emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 32, 179-183.
- Snedeker, S.M., 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect.* 109, 35-47.
- Spain, J.C., 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.* 49, 523-555.
- Sponza, D., 2003. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicol Environ Saf.* 54, 74-86.
- Staples, C.A., Murphy, S.R., McLaughlin, J.E., Leung, H.W., Cascieri, T.C., Farr, C.H., 2000. Determination of selected fate and aquatic toxicity characteristics of acrylic acid and a series of acrylic esters. *Chemosphere.* 40, 29-38.
- Stinchfield, A.E., Woods, M.G., 1995. Reducing chlorinated organics compounds from bleached kraft mills through first stage substitution of chlorine dioxide for chlorine. *Tappi J.* 78, 117-125.
- Stiner, L., Halverson, L.J., 2002. Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl Environ Microbiol.* 68, 1962-1971.
- Stirling, D.A., 2006. History of toxicology and allied sciences: A bibliographic review and guide to suggested readings. *Int J Toxicol.* 25, 261-268.
- Stohs, S.J., Ohia, S., Bagchi, D., 2002. Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 180, 97-105.

- Subramanian, C.V., 1983. *Hyphomycetes; Taxonomy and Biology* (1^a Ed). New York: Academic Press.
- Sun, F., Chen, H., 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere*. 71, 1866-1869.
- Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E., 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*. 57, 3310-3316.
- Sutherland, J.B., 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J Ind Microbiol*. 9, 53-62.
- Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., Reczey, K., 2000. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 using steam-pretreated spruce: hydrolytic potential of cellulases on different substrate. *Appl Biochem Biotechnol*. 86, 679-691.
- Thrane, U., Poulsen, S.B., Nirenberg, H.I., Lieckfeldt, E., 2001. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiol Lett*. 203, 249-255.
- Timnick, M.B., Barnett, H. L., Lilly, V.G., 1952. The Effect of method of Inoculation of media on sporulation of *Melanconium fuligineum*. *Mycologia*. 44, 141-149.
- Toyooka, T., Ibuki, Y., 2007. DNA damage induced by coexposure to PAHs and light. *Environ Toxicol Phar*. 23, 256-263.
- Trail, F., Mahanti, N., Linz, J., 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology*. 141, 755-765.
- Tulasne, L.-R. (1860). De quelques sphéries fungicoles, à propos d'un mémoire de M. Antoine de Bary sur les Nyctalis. *Annales des Sciences Naturelles Botaniques Series 4*. 13, 5-19.
- Ulmer, D.C., Leisola, M.S.A., Schmidt, B.H., Fiechter. A., 1983. Rapid degradation of isolated lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*. 45, 1795-1801.
- Valsaraj, K.T., Qaisi, K.M., Constant, W.D., Thibodeaux, L.J., Ro, K.S., 1998. Diffusive transport of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) from contaminated soil to overlying water. *J Hazard Mater*. 59, 1-6.

- Van den Brink, H.J.M., van Gorcom, R.F.M., van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.T., 1998. Review: Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol.* 23, 1-17.
- van Leeuwen, J.A., Nicholson, B.C., Levay, G., Hayes, K.P., Mulcahy, D.E., 1997. Transformation of free tetrachloroguaiacol to bound compounds by fungi isolated from Lake Bonney, south-eastern south Australia. *Mar Freshwater Res.* 48, 551-557.
- van Wyk, J.P.H., 1999. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biomass and Bioenergy.* 16, 239-242.
- van Wyk, J.P.H., 2001a. Sequential bioconversion of used paper to sugars by cellulases from *Trichoderma reesei* and *Penicillium funiculosum*. *The Environmentalist.* 21, 211-220.
- van Wyk, J.P.H., 2001b. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends Biotechnol.* 19, 172-177.
- van Wyk, J.P.H., Mohulatsi, M., 2003. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*. *Bioresour Technol.* 86, 21-23.
- Vankar, P.S., Bajpai, D., 2008. Phyto-remediation of chrome-VI of tannery effluent by *Trichoderma* species. *Desalination.* 222, 255-262.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M., 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl Environ Microbiol.* 60, 459-466.
- Verdin, A., Sahraoui, A.L., Durand, R., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int Biodeterior Biodegrad.* 53, 65-70.
- Verdin, A., Sahraoui, A.L.H., Robinson, G., Durand, R., 2005a. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *Int Biodeter Biodegr.* 55, 171-174.
- Verdin, A., Sahraoui, A.L.H., Newsam, R., Robinson, G., Durand, R., 2005b. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ Pollut.* 133, 283-291.

- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J.* 37, 1-20.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl Chem.* 73, 1163-1172.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., Sivasithamparam, K., 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.* 43, 143-148.
- Vullo, D., 2003. Microorganismos y metales pesados una interacción en beneficio del medio ambiente. *Rev Quím Viva.* 2, 1-20.
- Wainwright, M., 1988, Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil-A review. *Trans Br mycol Soc.* 90, 159-170.
- Walsh, G.A., Power, R.F., Headon, D.R., 1993. Enzymes in the animal feed industry. *Trends Biotechnol.* 11, 424-430.
- Watanabe, N., Yamagishi, M., Mizutani, T., Kondoh, H., Omura, S., Hanada, K., Kushida, K., 1990. CAF-603: a new antifungal carotane sesquiterpene. Isolation and structure elucidation. *J Nat Prod.* 53, 1176-1181.
- Waxman, D.J., Chen, L., Hecht, J.E., Jounaidi, Y., 1999. Cytochrome P-450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev.* 31, 503-522.
- Weil, J., Westgate, P., Kohlmann, K., Ladisch, M.R., 1994. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol.* 16, 1002-1004.
- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2001. Cytochromes P-450: a success story. *Gen Biol.* 1, 1-8.
- Whyte, L.G., Slagman, S.J., Pietrantonio, F., Bourbonniere, L., Koval, S.F., Lawrence, S.R., Innis, E.W., Greer, C.W., 1999. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus*.sp. strain Q15. *Appl Environ Microbiol.* 65, 2961-2968.
- Widdel, F., Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 12, 259-276.
- Widden, P., Scattolin, V., 1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80, 795-803.

- Willardson, B.M., Wilkins, J.F., Rand, T.A., Schupp, J.M., Hill, K.K., Keim, P., Jackson, P.J., 1998. Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl Environ Microbiol.* 64, 1006-1012.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, Y., Johnson, E.F., McRee, D.E., 2000. Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell.* 5, 121-131
- Williams, J., Clarkson, J.M., Mills, P.R., Cooper, R.M., 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl Environ Microbiol.* 69, 4190-4191.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut.* 81, 229-249.
- Wunch, K.G., Feibelman, T., Bennett, J.W., 1997. Screening for fungi capable of removing benzo[a]pyrene in culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47, 620-624.
- Yadav, S., Reddy, C.A. 1993. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 59, 756-762.
- Yamashita, H., 2000. Commercial production of mevalonolactone by fermentation and the application to skin cosmetics with anti-aging effect. *Frag J.* 28, 62-65.
- Zaldívar, M., Velásquez, J.C., Contreras, I. Pérez, L.M., 2001. *Trichoderma aureoviride* a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *Electron J Biotechnol.* 4, 1-7.
- Zayed, S.M., Mostafa, I.Y., Farghaly, M.M., Attaby, H.S., Adam, Y.M., Mahdy, F.M., 1983. Microbial degradation of trifluralin by *Aspergillus carneus*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma viride*. *J Environ Sci Health B.* 18, 253-67.
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubick, C.P., Xu, T., 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol Lett.* 251, 251-257.
- Zhao, X., Hardin, I.R., 2007. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes Pigm.* 73, 322-325.

ANEXO I

Secuencias obtenidas, con los iniciadores (uTf 5'-AACGTTACCAAACCTGTTG-3' y uTr 5'-AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3'), diseñados por Hagn *et al.* (2007) para identificar especies del género *Trichoderma*, de las cepas de estudio.

CP1

AAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCA
GCCCCGACCAAGGCGCCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTATTGTATAC
CCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTT
TCGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTG
TCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGAT
CGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCT
CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGC
CGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGGTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC
CCGCTGAA

CP22

AGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGG
TTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAA
TCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGT
CATTTC AACCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTA
CGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCA
GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACAC
CCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCCT

CP56

TGTTTTACGGACGTGKACGCGCCGCGCTCCCGGTGCGAGTTGTGCAAACCTACT
GCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTMTTTCGGGGCCGGCACCC
KTGTGAGGGGKCCYAATCCCCAACGCCGATCCCCCGGAGGSSYYCGWGRACT
TAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAWTAAYKTAGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTTCGATGATTC ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT
TTTGATTCATTTTGAATTTTGTCTCAGAGCTGTAAGAAATACGTCCGCGAGGG
GACTACAGAAAGAGTTTGGTTGGTTCCCTCCGGCGGGCGCCTGGTTCCGGGGC
TGCGACGCACCCGGGGCGTGACCGCGCCGAGGCAACAGTTT

CP3

TGTTKKACGGACGTGGACGCGCCGCGCTCCCGGYGCGAGTTGTGCMAMCYA
CTGCRACAGRAGAGGCYGCGSCGAGACCGCCMCTGYATKTCGGGKCSGGKATC
CCGTCTTAGGGGKKCSCGATCCCCAACGCCGACCCCMGRAGGSGTTTCGAGG
GTTGRRATGACGCTCGRWCAGGYAKRATACCCRCTGTACTTAAGGCGCAATG
TGC GTTCAGAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCG
CATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTTTGATTCATTTTGAATTTTTGCTCAGAGCTGTAAGAAATAACGTCCGCGAG
GAGACTACAGAAAGAGTTTTGGTTGGTCCCTCCGGCGGGCGCCTGGTTCCGGG
GCTGCGACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAGGCAACAGTTT

CPX

GCCGGAGGACYGACCWWATCTTTCTGTAGAACGANNNGGGGACGKNTTTCT
TTACAGYWCTRAGCAANAATTCAAAGGAATMAAACTTTCAASNCGGAT
CTCTTGGTTCTGGYATCNNTGARGAACGCWCCGAWWTGCKRTANGYMMTGT
GAATTGCAAATTCCTGAATCAWCGAATCTTTGAWCRCACWTTGMGCCCCG
CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGANCGTCATTTCAACCCTCTAACCCC
TCCGGGGGATCGGCGYTGGGGATCGGGNCCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCK
AAANNCAGTGGCGGGCTCGCCGCAATCCTC

CPTGC

GCGGCCGCCGGAGGAACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGGNNNNNNNNGACGT
ATTTCTTACAGCTCTGAGMAAAAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC
CTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCC
GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGYACAA
CTCGCACCCGGAGCGCGGGCGGTCCACGTCCGTWWAACAMCCAACTTTTCT
GAAATG

CP46

GGACAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTATTGTACATTCCMNG
GCGGGTTTTTTACTATCWGAKCCATCTCGGCGMMMMTCKWGGGCGTTTCGA
AAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCNATGAAG
AACGCAKCTMAATGMGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGAGTATTCTGGCGGGYATGCCTGTC
CGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGAGTTGGGGATCG
GCCCTTACGGGGCCGGCCCCGAAAW

CP23

ACGGACGTGGACGCGCCGYGCTCCGGTGCAGATTGTGCMNNACTRNGNN
GGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTATTTGGGGCCGGGATCCCGTCTT
AGGGGTTCCCGATCCCNACGCCGACCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAA
TGACGCYCKGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTT
CAAAGATTCGATGATTCACACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGA
TTCATTTTGAATTTTTGCTCAAAGCTGTNNGAAATAACGTCCGCGAGGGGACT
ACAGAAAGAGTTTGGTTGGTCCCTCC

CP37

GTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCATCGCAGCCCC
GGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCT
CGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCTCGTGGGCGTTTCGAA
AATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGC
CCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC
TGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGCGTCCACAGCCGTT
AAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC
TGAAC

ANEXO II

Método colorimétrico para determinar proteínas (Bradford, 1976)

Referencia: Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Reactivos:

Tris-HCl 1 M, pH=8.6 (6.05 g y 1.05 mL de HCl concentrado en 48.95 mL de agua desionizada)

Tris-HCl 0.1 M, pH=8.6 (5 mL de la solución Tris-HCl 1M, en 45 mL de agua desionizada; ajustar el pH a 8.6 con NaOH)

Reactivo Bradford

Albumina de bovino para preparar la curva de calibración

Procedimiento:

a) Preparación y extracción de la muestra

- Pesar aproximadamente 0.025 g del tejido fúngico
- Colocar el material fúngico en un mortero estéril
- Adicionar 1 mL de Tris-HCl 0.1M, pH=8.6
- Macerar el tejido fúngico con el buffer Tris-HCl 0.1M, pH=8.6
- Pasar el macerado a un tubo estéril de 1.5 mL
- Centrifugar a 14, 000 rpm (~29,000 g) por 10 min
- Colocar el sobrenadante en un tubo estéril de 1.5 mL nuevo
- Almacenar la muestra a 4 ° C (procesar la muestra antes de una semana)

b) Preparación de la curva de calibración

- Diluir 0.05 g de albumina de bovino en 50 mL de agua desionizada (concentración 1000 mg L⁻¹)
- Preparar otra solución con 2.5 mL de la solución 1000 mg L⁻¹ de albumina de bovino y 47.5 mL de agua desionizada (concentración final de 50 mg L⁻¹)
- Preparar los puntos de la curva de calibración

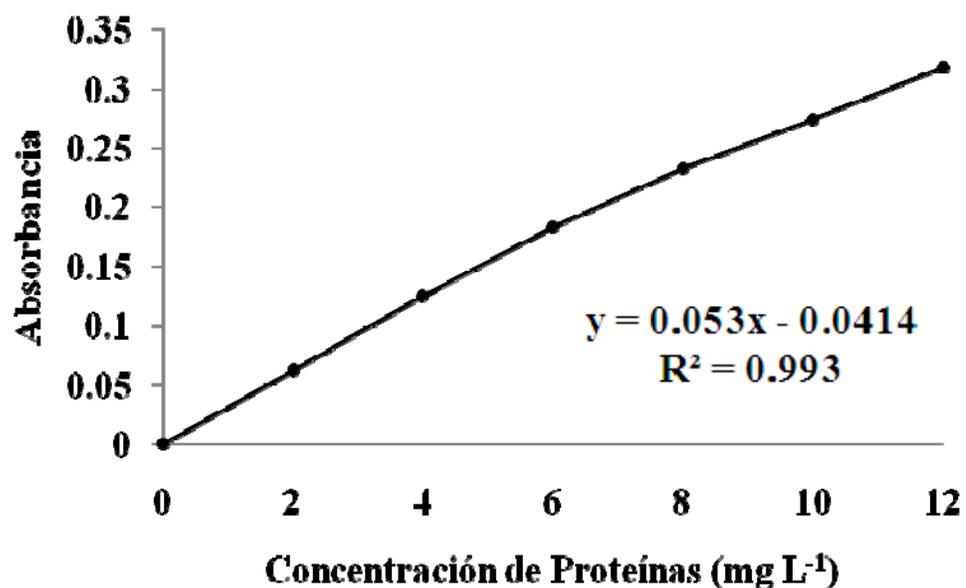
Estándar	1	2	3	4	5	6	7
Concentración de albumina de bovino (mg L ⁻¹)	0	2	4	6	8	10	12
Volumen del stock de albumina de bovino 50 mg L ⁻¹ (μL)	0	40	80	120	160	200	240
Volumen de agua desionizada (μL)	800	760	720	680	640	600	560
Volumen del reactivo Bradford (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Volumen total (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

- Colocar 300 μL de cada uno de los estándar en la microplaca (por triplicado)
- Leer la absorbancia a 595 nm

c) Determinación de proteínas en la muestra fúngica

- Colocar en un tubo estéril de 1.5 mL, 10 μL del extracto de la muestra fúngica
- Adicionar 50 μL del reactivo Bradford y 240 μL de agua desionizada
- Llevar al vortex para mezclar
- Colocar 300 μL de cada muestra fúngica en la microplaca (por triplicado)
- Leer la absorbancia a 595 nm
- Expresar los resultados en mg g⁻¹ de tejido fúngico

d) Curva de calibración para el método de Bradford



ANEXO III

Método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico para la microdeterminación de carbohidratos totales (Dubois *et al.*, 1956)

Referencia: Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28, 350-356.

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos puede ser determinado cuando éstos reaccionan con fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado, originando un color naranja muy estable. La cantidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes.

Reactivos:

Fenol al 5% (5 g de fenol en 100 mL de agua desionizada)

Ácido sulfúrico concentrado

Glucosa para preparar la curva de calibración

Procedimiento:

a) Preparación de la muestra

- Colocar un tubo estéril de 1.5 mL, 7 μ L del medio mineral donde creció el hongo y adicionar 993 μ L de agua desionizada
- Llevar al vortex para mezclar
- Almacenar la muestra a 4 ° C (procesar la muestra antes de una semana)

b) Preparación de la curva de calibración

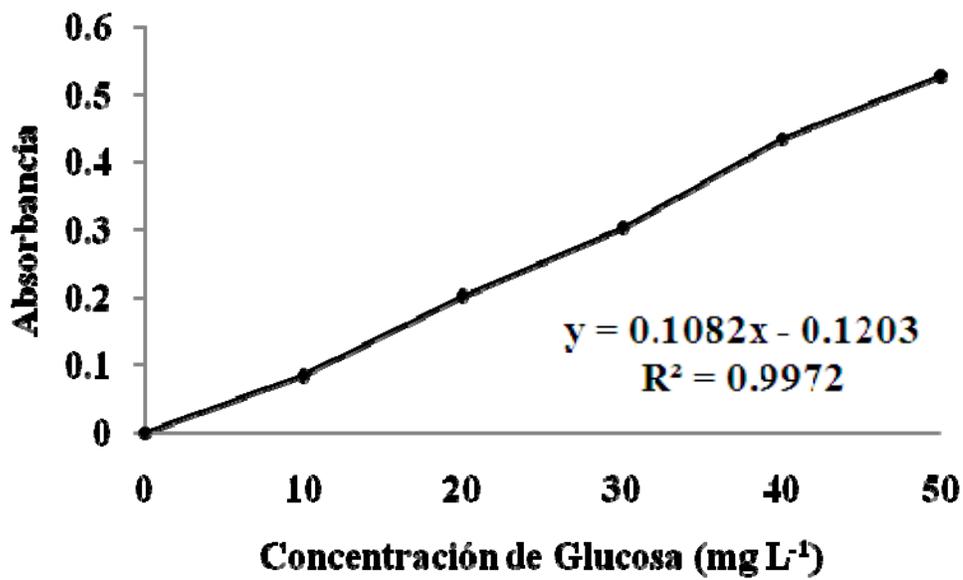
- Diluir 0.01 g de glucosa en 100 mL de agua desionizada (concentración 1000 mg L⁻¹)
- Preparar otra solución con 20 mL de la solución 1000 mg L⁻¹ de glucosa y 30 mL de agua desionizada (concentración final de 400 mg L⁻¹)
- Preparar los puntos de la curva de calibración

Estándar	1	2	3	4	5	6
Concentración de glucosa (mg L ⁻¹)	0	10	20	30	40	50
Volumen del stock de glucosa 400 mg L ⁻¹ (μ L)	0	25	50	75	100	125
Volumen de agua desionizada (μ L)	1000	975	950	925	900	875
Volumen total (μ L)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

c) Determinación de azúcares totales en el medio mineral donde creció el hongo y los estándares

- Colocar en un tubo de ensayo de vidrio liso, 1 mL de la muestra o de los estándares
- Adicionar 0.5 mL de fenol al 5% y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado
- Llevar al vortex para mezclar
- Dejar reposar de 10 a 15 min
- Poner el tubo de ensayo en un baño de agua a 30 °C por 15 min
- Transferir 300 μL de cada muestra y estándares a la microplaca (por triplicado)
- Leer la absorbancia a 492 nm
- Expresar los resultados en mg g^{-1} de tejido fúngico

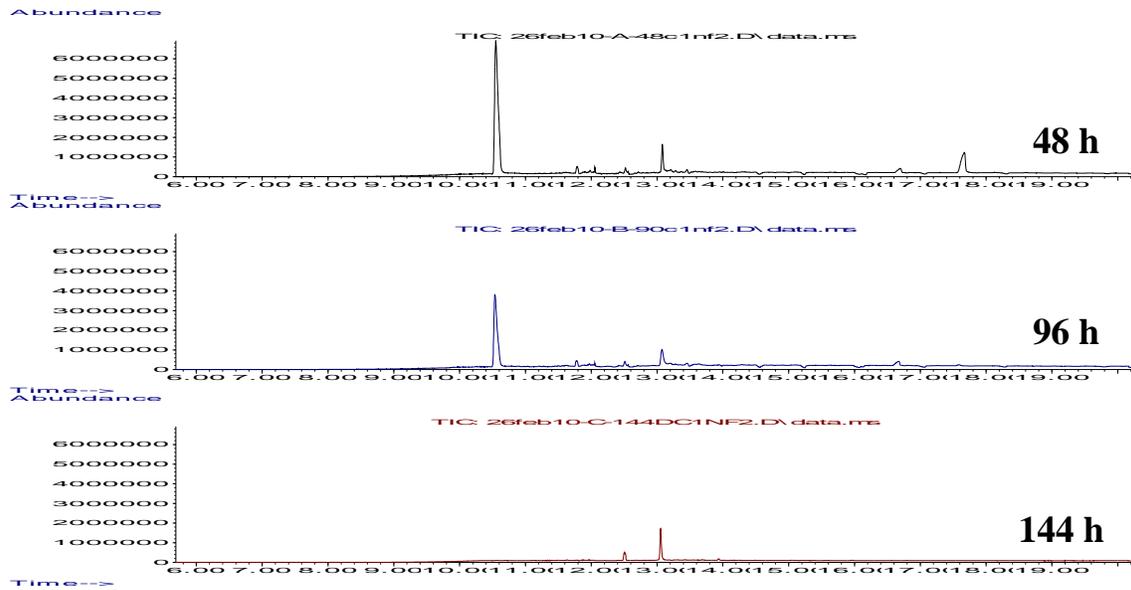
d) Curva de calibración para el método de Dubois



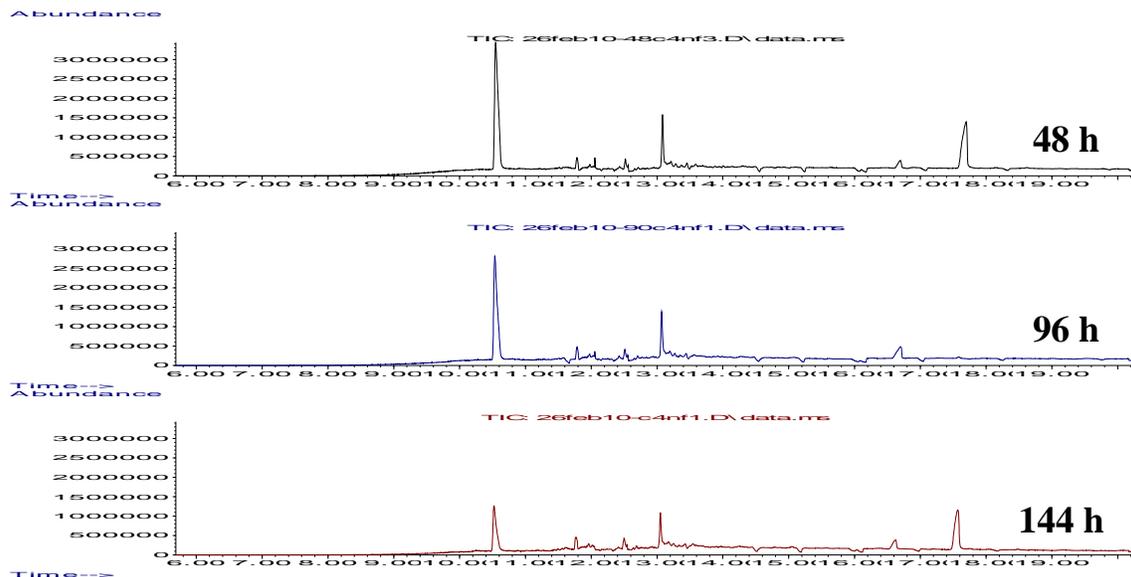
ANEXO IV

Cromatogramas de algunos de los tratamientos expuestos a naftaleno fenantreno y benzo[a]pireno, inoculados con las cepas fúngicas CP1 y CP4

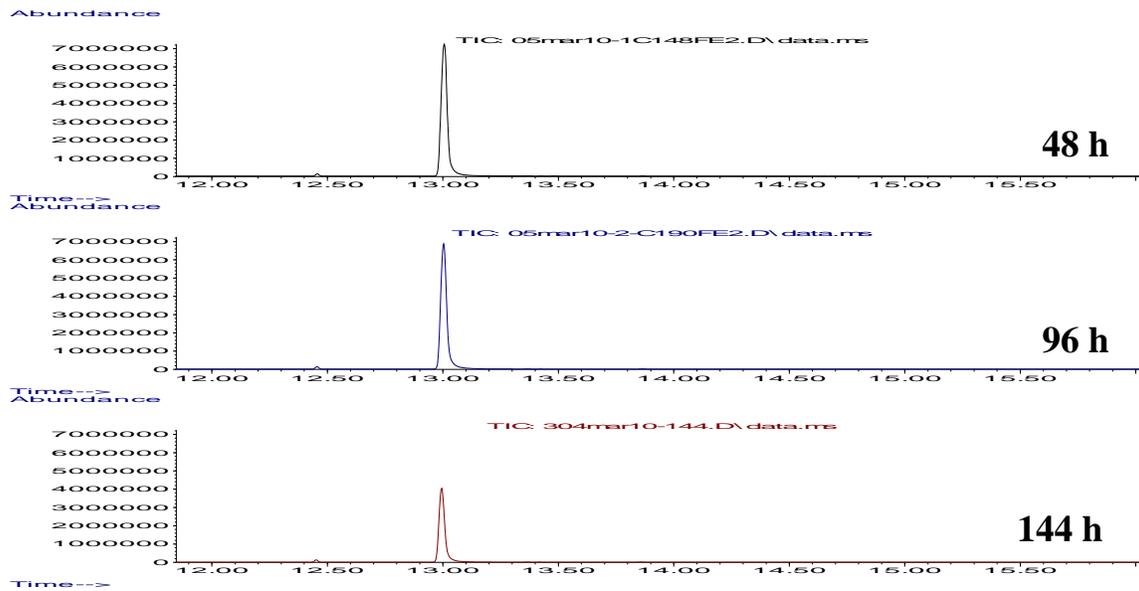
Tratamientos inoculados con la cepa fúngica CP1 (*Trichoderma virens*) en presencia de naftaleno (100 mg L^{-1}), a las 48, 96 y 144 h.



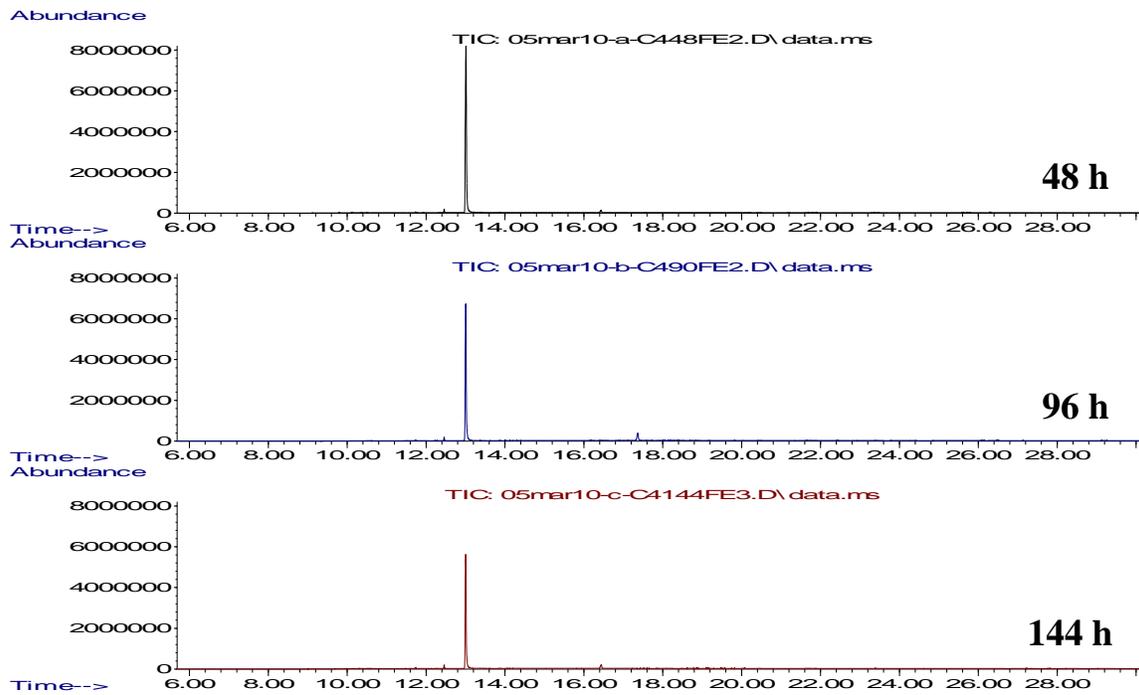
Tratamientos inoculados con la cepa fúngica CP4 (*Trichoderma viride*) en presencia de naftaleno (100 mg L^{-1}), a las 48, 96 y 144 h



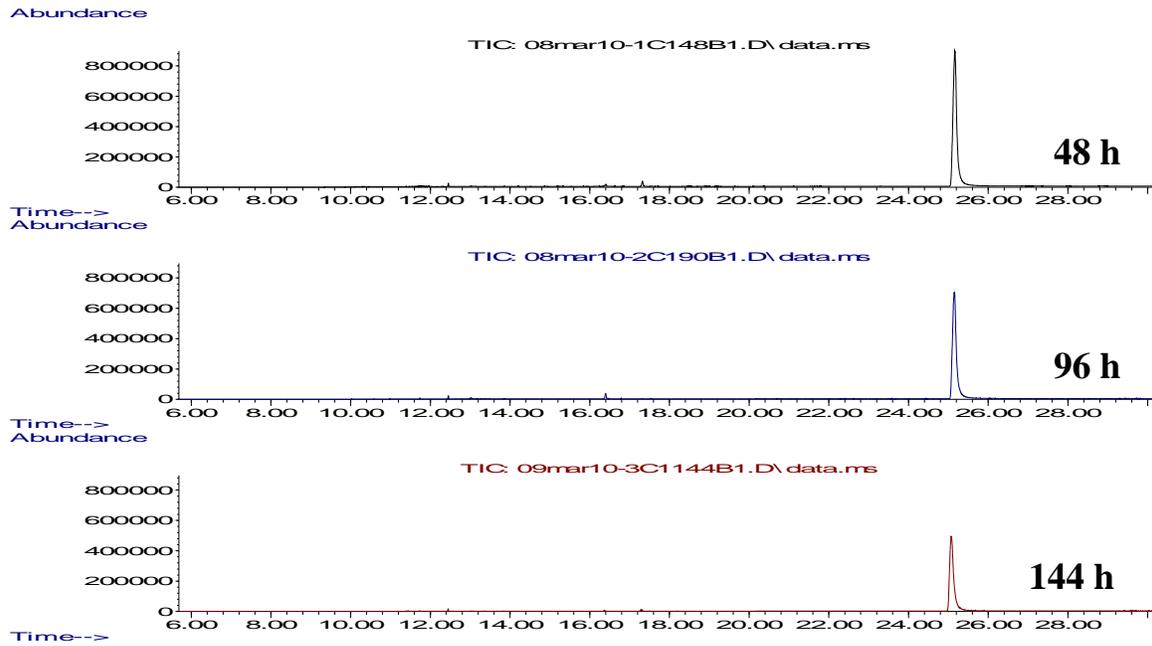
Tratamientos inoculados con la cepa fúngica CP1 (*Trichoderma virens*) en presencia de fenantreno (100 mg L⁻¹), a las 48, 96 y 144 h.



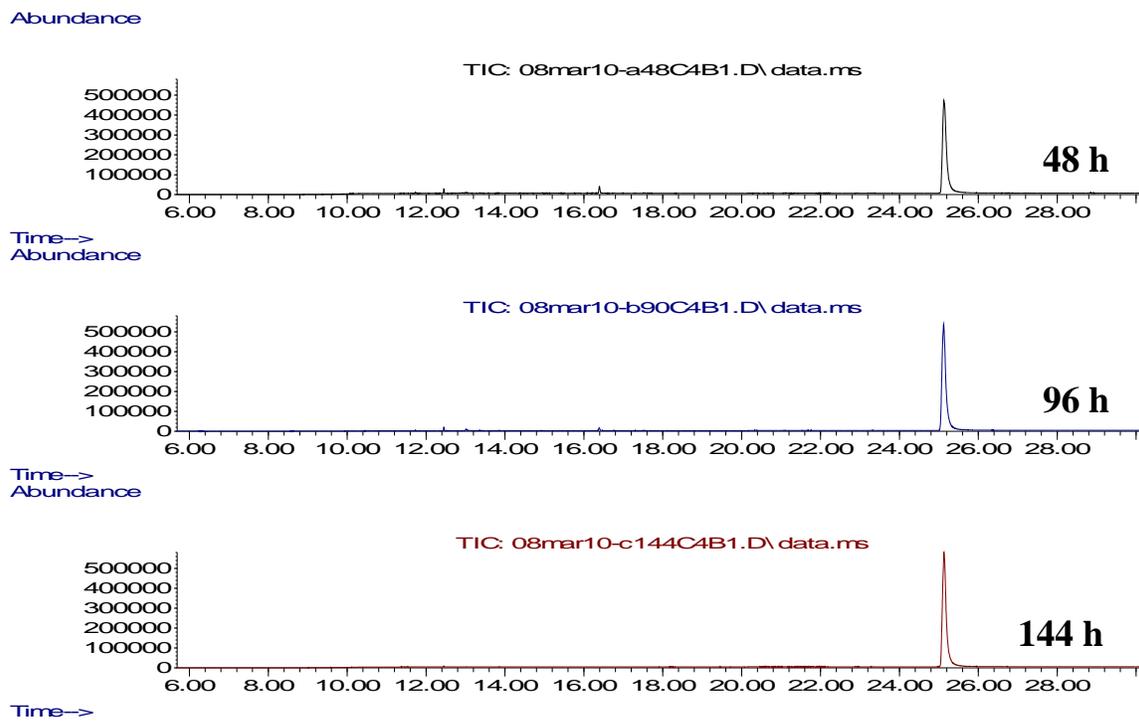
Tratamientos inoculados con la cepa fúngica CP4 (*Trichoderma viride*) en presencia de fenantreno (100 mg L⁻¹), a las 48, 96 y 144 h.



Tratamientos inoculados con la cepa fúngica CP1 (*Trichoderma virens*) en presencia de benzo[*a*]pireno (100 mg L⁻¹), a las 48, 96 y 144 h.



Tratamientos inoculados con la cepa fúngica CP4 (*Trichoderma viride*) en presencia de benzo[*a*]pireno (100 mg L⁻¹), a las 48, 96 y 144 h.



ANEXO V

CUADRO 5.1. BIOMASA FRESCA, BIOMASA SECA, PROTEÍNAS Y CONSUMO DE GLUCOSA DE DOS LA CEPAS DE *Trichoderma* EXPUESTAS A NAFTALENO, FENANTRENO Y BENZO[a]PIRENO.

	CEPA CP1			CEPA CP4		
	48 h	96 h	144 h	48 h	96 h	144h
Biomasa fresca (g)						
Control	0.3072	0.3154	0.2632	0.2546	0.3258	0.3124
Naftaleno	0.2143	0.3257	0.3229	0.2495	0.3491	0.3988
Fenantreno	0.1683	0.1908	0.3133	0.0241	0.1298	0.4792
Benzo[a]pireno	0.2376	0.3249	0.3109	0.0448	0.3894	0.3310
Biomasa seca (g)						
Control	0.1046	0.1059	0.1021	0.0970	0.1193	0.1029
Naftaleno	0.0676	0.1117	0.1102	0.0676	0.1073	0.1061
Fenantreno	0.0460	0.0618	0.0982	0.0068	0.0465	0.1286
Benzo[a]pireno	0.0750	0.1056	0.1057	0.0125	0.0932	0.0825
Proteínas (mg g⁻¹)						
Control	7.3847	6.5143	5.2455	9.7946	10.0423	8.9992
Naftaleno	5.7088	4.3742	5.2831	5.4009	6.8440	8.8805
Fenantreno	7.4511	6.2570	7.3925	13.0910	7.1935	5.2595
Benzo[a]pireno	5.5720	4.5357	4.9727	17.2327	5.0730	7.9328
Glucosa consumida (mg L⁻¹)						
Control	4457	5014	5070	3018	4979	5205
Naftaleno	3499	5046	5255	898	4935	5234
Fenantreno	1958	3855	4227	305	1931	4558
Benzo[a]pireno	1884	4531	4860	1296	3943	4527

ANEXO VI

Publicaciones generadas

Annals of Microbiology, 58 (4) 761-763 (2008)

A rapid and versatile method for the isolation of total RNA from the filamentous fungus *Trichoderma* sp.

Rosalba ARGÜMEDO-DELIRIA¹, Daniel GONZÁLEZ-MENDOZA^{2*}, Alejandro ALARCÓN¹

¹Área de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados Campus Montedillo, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecitorio 36230, Texcoco, Estado de México; ²Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Carretera a Delta s/n Ejido Nuevo León 21705 Baja California, México

Received 16 June 2008 / Accepted 10 September 2008

Abstract - RNA isolation is essential to study gene expression at the molecular level. However, RNA isolation is especially difficult in organisms such as filamentous fungi which contain compounds that bind and/or co-precipitate with RNA. No commercial kit is yet available for the isolation of high-quality RNA from these organisms. Furthermore, because of the large amounts of polysaccharides, the common protocols for RNA isolation usually result in poor yields when applied to *Trichoderma*. A simple and fast protocol for the isolation of RNA with high yields that effectively remove contaminating substances is introduced here. The protocol is based on the CDC/phenol cellular sample treatment method, with the following modifications: a phenol/chloroform extraction step for removal of proteins, DNA, and polysaccharides by precipitation without β -mercaptoethanol and liquid nitrogen. This procedure may be useful for the isolation of RNA from other filamentous fungi and may serve as an important tool for the molecular analysis of these organisms.

Key words: *Trichoderma* spp., RNA Isolation, SDS-TRIS.

INTRODUCTION

Trichoderma species are imperfect filamentous fungi with teleomorphs belonging to the Hypocerales order in the Ascomycota division. Strains of *Trichoderma* have the ability to degrade plant polymers and have biotechnological importance, as fungal biocontrol agents (Harper and Lynch, 1985; Harmann, 2000; Howell, 2003). The isolation of pure RNA is crucial for the study of gene expression in *Trichoderma*, because it is a pre-requisite for several molecular biology techniques, including gene isolation by RT-PCR (reverse transcription coupled with polymerase chain reaction), gene expression profiling, Northern blot, and construction of cDNA libraries (Vinals et al., 2008). However, molecular biological studies have been hampered due to problems in obtaining sufficient amounts of good quality RNA from *Trichoderma*. Cell walls or fungal structures (i.e., conidia or hyphae), which are not readily susceptible to lysis, magnify thresholds and often lead to modifications of existing protocols (Meio et al., 2006). There have been some reports on total RNA isolation from filamentous fungi (Mukhtar et al., 1998), however, an optimised protocol that provides high quantities of pure total RNA for gene expression studies is lacking. Therefore the objective of this study was to develop an easy and rapid protocol for the isolation of good quality total RNA from *Trichoderma* spp. biomass.

MATERIALS AND METHODS

Fungal material. *Trichoderma* sp. strain CP1, was grown on Potato Dextrose agar (PDA, Baker®) Petri dishes of 9-cm diameter, at 25 °C until mycelium completely covered the agar surface. Mycelium were collected by filtration with a Millipore apparatus and approximately 10 mg of mycelium were transferred to a 1.5 ml microtube and stored at -80 °C until used.

RNA extraction buffer and solutions. The tubes and bottles were treated with 0.1% DEPC solution at 37 °C overnight, autoclaved twice at 121 °C for 20 min, and then dried at 100 °C before use. Tips used for RNA extraction were RNase-free and DNase-free (Axygen®, USA). The extraction buffer was 2% SDS (w/v) containing 0.5 mM EDTA, 0.1 mM hydroxymethyl- γ -hydrochloride (Tris-HCl, pH 8.0), and 0.1 % DEPC (v/v) at pH 8.0. Additionally, a mixture of chloroform/phenol (1:1 v/v) was also prepared. All buffers and solutions were incubated at 37 °C overnight prior to autoclaving (121 °C, 20 min).

RNA extraction procedure. Extraction buffer (0.2 ml) was added to 10 mg of *Trichoderma* mycelium and shaken vigorously for 15 s. Then 0.2 ml of chloroform-phenol mix was slowly added and incubated at 65 °C for 5 min. The mixture was cooled to room temperature and centrifuged at: 10000 \times g, 4 °C for 5 min. The supernatant was transferred to a new microtube, and 1-fold volume of cold absolute isopropanol or ethanol was added

* Corresponding author. Fax: +52 (686)523-02-17; E-mail: daniasaf@gmail.com

Revisión / Review

EL GÉNERO FÚNGICO *Trichoderma* Y SU RELACIÓN CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS

Rosalba ARGUMEDO-DELIRA¹, Alejandro ALARCÓN^{1*}, Ronald FERRERA-CERATO¹ y Juan José PEÑA-CABRIALES²

¹ Área de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo 56230, Estado de México.* Correo electrónico: aalarconcp@gmail.com. Tel. (595) 952-0200 Ext. 1280; Fax (595) 952-0287

² Laboratorio de Microbiología Ambiental, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Km 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, Guanajuato

(Recibido agosto 2008, aceptado febrero 2009)

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos del petróleo, plaguicidas, metales pesados

RESUMEN

Las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. Sin embargo, los estudios sobre su comportamiento y su efecto en ambientes terrestres y acuáticos contaminados han sido escasamente estudiados. Esta revisión pretende hacer una compilación de toda la información actualizada disponible, respecto a la interacción de *Trichoderma* en presencia de contaminantes de origen orgánico (hidrocarburos del petróleo, explosivos y plaguicidas) e inorgánico (metales pesados y cianuro) con el fin de conocer el potencial de este grupo fúngico en la biorremediación de ambientes contaminados. No obstante, para tales fines, es necesario realizar investigaciones enfocadas en evaluar sus respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares ante diferentes tipos de contaminantes, y definir con ello su posible aplicación en los diferentes sistemas de biorremediación.

Key words: bioremediation, petroleum hydrocarbons, pesticides, heavy metals

ABSTRACT

The *Trichoderma* fungal species have been fully characterized due to their application to agriculture since they are important antagonists for several horticultural plant pathogens. In contrast, the behavior and the effects of these fungi at contaminated soils have been scarcely studied. This review compiles updated information about the interactions among *Trichoderma* species and organic (petroleum hydrocarbons, explosives, and pesticides) and inorganic (heavy metals and cyanide) pollutants in order to know their potential for remediating contaminated environments. Nevertheless, for such purposes, it is needed further experimental research based on applying *Trichoderma* species either to study their physiological, biochemical and molecular responses when exposed to several types of pollutants, or to assess their potential application into the several processes of bioremediation.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman



Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene

Rosalba Argumedo-Delira^a, Alejandro Alarcón^{a*}, Ronald Ferrera-Cerrato^a, Juan José Almaraz^a, Juan José Peña-Cabrales^b

^aArea de Microbiología, Programa de Edifragil, Colegio de Postgraduados, Carrtera México-Tlaxcala km 36.5, Neurólio 56200, Amozoc de Abasco, México
^bDepartamento de Biotecnología y Biorreactores, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato, México

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 2 September 2009
 Received in revised form
 8 August 2010
 Accepted 16 August 2010
 Available online xxx

Keywords:
 Petroleum hydrocarbons
 Polycyclic aromatic hydrocarbons
 Fungal growth

ABSTRACT

Petroleum hydrocarbons (PH) are major organic contaminants in soils, whose degradation process is mediated by microorganisms such as the filamentous fungi *Cunninghamella elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. However, little is known about the tolerance and the degradation capability of *Trichoderma* species when exposed to PH. This research evaluated the tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil (CO), naphthalene (NAH), phenanthrene (PH) and benzo[a]pyrene (BaP) by using *in vitro* systems. Petri dishes containing solid minimal medium were separately contaminated with CO, with seven doses of either NAH or PH (250, 500, 750, 1000, 2000, and 3000 mg L⁻¹), and with six doses of BaP (0, 25, 50, 75, and 100 mg L⁻¹). Non-contaminated plates were used as controls. *Trichoderma* strains were exposed to all the contaminants by triplicate, and the growth of each fungal colony was daily recorded. No significant differences were observed among *Trichoderma* strains when they were exposed to CO, in which the maximum fungal growth was reached at 96 h. In contrast, *Trichoderma* strains showed variations in tolerance and grow under different doses of either NAH, PH or BaP. Increasing NAH doses resulted on significant greater fungal growth inhibition than PH doses. The exposure to BaP did not inhibited growth of some *Trichoderma* strains.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Crude oil (CO) is composed of four different types of hydrocarbons: saturated, aromatics, asphaltenes and resins (Leahy and Gilwell, 1990; Harayama, 1997). Among the aromatic fraction, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are constituted by two or more aromatic rings. The stability and the hydrophobic properties of these compounds confer more persistence and recalcitrance in the environment (Kanuly and Harayama, 2000). In addition, these aromatic compounds are also considered as teratogenic and/or mutagenic agents (Chen and Liao, 2005). Biodegradation of PAHs via microbial activity has been well documented, especially for bacteria such as *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Gordonia*, *Demingella*, *Mycobacterium* and *Metaspirillum*, among others (Widdel and Rabus, 2001), and fungi such as *Cunninghamella elegans* and *Phanerochaete chrysosporium* (Cerniglia and Yang, 1984; Bumpus, 1989; Sutherland et al., 1991; Pothuluri et al., 1992; Cerniglia et al., 1994; Moen and Hammel, 1994). In contrast, the influence of

Trichoderma species on the degradation of PAH has been scarcely described.

Trichoderma species belong to the group of filamentous fungi classified as Ascomycetes as a part of the Hypococcales Order in which at least 30 species are known (Liedtke et al., 1999). These fungi are characterized for being one of the most distributed fungal groups in terrestrial (agricultural systems, grasslands, forests, and deserts) and aquatic ecosystems (Zhang et al., 2005) since they have high reproductive rate that confers their ability to colonize several environments. Some *Trichoderma* species are free living, opportunists or plant symbionts, and others are mycoparasites (Bisset, 1991; Harman et al., 2004). In addition, the nutritional requirements of this fungal group are considered to be low since they can survive under adverse conditions; however, the fungal growth in soil is also favored by the presence of organic matter and moisture, and the optimal temperature is between 25 and 30 °C (Papavasiliou, 1985). The genus *Trichoderma* is important for plant species since its fungal species have mycoparasitic and antibiotic capabilities by which they may control the growth and incidence of microorganisms that cause diseases in several horticultural plants (Score and Palfreyman, 1994; Dushnina and Kulicov, 2005; Avila-Miranda et al., 2006; Rojo et al., 2007).

* Corresponding author. Tel./fax: +52 (56) 952 0287.
 E-mail address: alarconaj@ira.cinvestav.mx (A. Alarcón).