



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA
REGIONAL

**SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCTORAS DE
LACASAS Y SU POTENCIAL DE APLICACIÓN A PROCESOS DE
BIORREMEDIACIÓN EN ZONAS CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS
EN MÉXICO**

TERESITA SPEZZIA MAZZOCCO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2012



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE- 43-2-03

CAMPUS PUEBLA

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR

Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Teresita Spezzia Mazzocco** alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de biorremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla septiembre de 2012.

Teresita Spezzia Mazzocco

Vo. Bo. Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de biorremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México**, realizada por la alumna: **Teresita Spezzia Mazzocco**, 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

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:


DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:


DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:


DR. BENITO RAMÍREZ VALVERDE

Puebla, Puebla, México, septiembre de 2012

SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCTORAS DE LACASAS Y SU POTENCIAL DE APLICACIÓN A PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN EN ZONAS CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS EN MÉXICO

Teresita Spezzia Mazzocco, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

Quince cepas de hongos comestibles pertenecientes a los géneros *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lentinula* y *Coprinopsis*, fueron evaluadas en cuanto a su actividad enzimática utilizando el medio de cultivo agar con extracto de malta (EMA), adicionado con ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,6-dimetoxifenol (DMP) y guayacol. Se seleccionaron nueve cepas para determinar cuantitativamente la actividad de lacasas. Esta evaluación se realizó con el medio de cultivo de extracto de malta líquido (EMB) suplementado con 0.1 mM de sulfato de cobre. Se demostró que las cepas CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y CP-267 de *P. pulmonarius* son altamente productoras de actividad de lacasas, obteniéndose 4,000 U/ml y 2,500 U/ml, respectivamente. Estas cepas fueron considerablemente superiores en actividad de lacasas, con respecto a cepas de otras especies y géneros evaluadas (*Ganoderma*, *Lentinula*, *Coprinopsis*). Debido a que la cepa CP-50 presentó la mayor actividad de lacasas, esta fue utilizada en las pruebas de biorremediación *in vitro*, empleando el hidrocarburo aromático policíclico (HAP) antraceno (en polvo) directamente sobre el medio EMA. Se demostró que el micelio de la cepa CP-50 se desarrolló de manera normal aún en presencia de altas concentraciones de antraceno (0.1 g/25 ml), e incluso se observó un efecto de estimulación sobre su desarrollo. El método de evaluación desarrollado en este estudio demostró ser sencillo y eficiente, además de permitir la utilización de altas concentraciones de antraceno. Se propone una estrategia de biorremediación *in situ* para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo, en suelos agrícolas contaminados, utilizando el sustrato residual de la producción comercial de hongos comestibles colonizado por micelio.

Palabras clave: antraceno, biorremediación, hongos comestibles, lacasas.

**SELECTION OF EDIBLE MUSHROOM STRAINS PRODUCING LACCASES AND ITS
POTENTIAL FOR APPLICATION TO BIORREMEDIACIÓN PROCESSES IN
CONTAMINATED AREAS WITH HYDROCARBONS IN MÉXICO**

Teresita Spezzia Mazzocco, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

Fifteen Basidiomycete fungi belonging to the genera *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lentinula* and *Coprinopsis* were qualitatively evaluated using malt extract agar (EMA). 2-2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 2,6-dimethoxyphenol (DMP) or guayacol substrate were added to the EMA medium. Nine strains were selected and quantitatively tested for laccase activity. Copper sulfate (0.1 mM) added to the liquid malt extract (EMB) medium was used for this evaluation. High laccase activity was recorded in the strains CP-50 (4,000 U/ml) and CP-267 (2,500 U/ml) of *Pleurotus pulmonarius*. The genus *Pleurotus* showed higher laccase activity in comparison with the strains of the other genera studied (*Coprinopsis*, *Ganoderma*, *Lentinula*). The strain CP-50 was selected for further *in vitro* experiments using anthracene powder (0.1 g/25 ml) added to EMA. Data showed not only tolerance to the polycyclic aromatic hydrocarbon, but also promotion of mycelial growth. This method is useful for testing tolerance of fungi to other toxic compounds associated to bioremediation processes. A general strategy for using the spent substrate from commercial mushroom cultivation in Mexico for *in situ* bioremediation is discussed.

Key words: anthracene, bioremediation, laccase, mushrooms.

DEDICADA A MI HIJO SAMUEL
UN ESTUPENDO COMPAÑERITO DE AVENTURAS!!!

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la oportunidad de la vida.

A mi familia por el apoyo incondicional.

Al Colegio de Postgraduados, a mi director de tesis, asesores y demás profesores por contribuir a mi formación académica.

Al CONACYT, por haber apoyado mis estudios, a través de la beca mixta 204414. Durante el período de Septiembre 2006-Agosto 2010, tiempo en el que realice estudios en México y una estancia doctoral en Alemania.

A la profesora Kües y todo su equipo por permitirme realizar la estancia en sus laboratorios en la Universidad Georg-August de Göttingen, Alemania. Los resultados de dicha estancia fueron entregados personalmente a la profesora Kües, los cuales no forman parte de la presente tesis.

CONTENIDO

PARTE I: MARCO CONCEPTUAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los hongos comestibles	1
1.2. La contaminación por hidrocarburos del petróleo, un problema global	4
1.3. Remediación y biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo	6
1.4. La actividad enzimática de los hongos comestibles productores de lacasas	12
II. ANTECEDENTES	16
2.1. La crisis de la industria petrolera y las implicaciones ambientales en México	16
2.2. El potencial de los hongos comestibles y los sustratos residuales derivados de la producción comercial en la biorremediación	23
2.3. La situación actual en México	25
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS GENERAL	29
V. OBJETIVO GENERAL	29
PARTE II: DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
CAPÍTULO I. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS PRODUCIDAS POR HONGOS COMESTIBLES	30
1.1. RESUMEN	30
1.2. OBJETIVOS	30
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.3.1. Material biológico	31
1.3.2. Evaluación de la producción de la actividad de lacasas	32
1.4. RESULTADOS	37
1.4.1. Evaluación de la producción de la actividad de lacasas	37
1.5. DISCUSIÓN	72
1.6. CONCLUSIONES	78

1.7. RECOMENDACIONES	78
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS DE LA CEPA CP-50 DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> EN PRESENCIA DE ANTRACENO	79
2.1. RESUMEN	79
2.2. OBJETIVOS	80
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	80
2.3.1. Medios de cultivo y soluciones	80
2.3.2. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia de antraceno	81
2.3.3. Área de crecimiento micelial	85
2.3.4. Concentración de proteína	85
2.4. RESULTADOS	86
2.4.1. Tolerancia de la cepa para crecer en presencia de antraceno	86
2.4.2. Observaciones morfológicas	88
2.4.3. Actividad de lacasas	91
2.4.4. Área micelial	100
2.4.5. Producción de proteína	102
2.5. DISCUSIÓN	104
2.6. CONCLUSIONES	114
2.7. RECOMENDACIONES	114
CAPÍTULO III. ESTRATEGIA PARA EL MANEJO Y APLICACIÓN DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCTORAS DE LACASAS, EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN <i>IN SITU</i> DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	116
3.1. INTRODUCCIÓN	116
3.2. ACTORES DE LA ESTRATEGIA	118
3.3. EL SUJETO SOCIAL DE LA ESTRATEGIA	119
3.4. ENFOQUE SOCIAL DEL PROBLEMA	119
3.5. ESTRATEGIA DE MANEJO Y APLICACIÓN DE LAS CEPAS BIORREMEDIADORAS	120

3.6. ACCIONES ESPECÍFICAS DE LA PROPUESTA	121
3.6.1. Estrategia científica a corto plazo	122
3.6.2. Estrategia científica a mediano plazo	122
3.6.3. Estrategia científica a largo plazo	123
V. CONCLUSIONES GENERALES	125
IV. RECOMENDACIONES GENERALES	126
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXO I ACTIVIDAD DE LACASAS DE LA DIFERENTES CEPAS DE HONGOS BASIDIOMICETOS EVALUADOS	140
ANEXO II ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS PRESENTADA POR LAS CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO	148
ANEXO III ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS, ÁREA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS, PRESENTADA POR LAS CEPA CP-50 CRECIENDO EN PRESENCIA DE ANTRACENO	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los basidiomicetos superiores (<i>Pleurotus ostreatus</i>) (Martínez-Carrera, 1998).	2
Figura 2. Etapas generales de la degradación de compuestos aromáticos del petróleo (Levin y Gealt, 1997).	11
Figura 3. Estructura química de la lignina (Del Río, 2005).	13
Figura 4. Tomas clandestinas de extracción de petróleo de 1999-2006 (Pemex, 2007).	19
Figura 5. Tomas clandestinas de petróleo, reportadas por Pemex refinación durante el primer semestre de cada año (Pemex, 2007).	19
Figura 6. Número de casos de derrames y fugas con hidrocarburos en las cuatro divisiones del proceso del petróleo en Pemex (Pemex, 2007).	21
Figura 7. Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a la PROFEPA entre 1997 y 1999 (SEMARNAT, 2007).	22
Figura 8. Tecnologías de remediación para suelos utilizadas en México por empresas autorizadas. SF: Separación física. EV: Extracción de vapores. DT: Desorción térmica. C: Centrifugación (SEMARNAT, 2007).	26
Figura 9. Medición de pH en medios de cultivos con colonias miceliales adicionados con diferentes sustratos. A: Homogenización con mezcladora comercial. B: Medios de cultivo homogenizados en tubos falcon. C: Medición de pH de medios de cultivo homogeneizados.	33
Figura 10. Colonización del hongo en el medio de cultivo estacionario o precultivo.	34
Figura 11. Cepas de hongos comestibles creciendo en medio EMB para la evaluación de actividad de lacasas. A: Incubadora con matraces inoculados con hongos. B: Pellets de hongos creciendo en medio EMB.	35
Figura 12. Medición de la actividad de lacasas, A: Llenado de microplaca con solución buffer. B: Lectura de la oxidación de ABTS en espectrofotómetro.	36
Figura 13. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-5 de <i>Lentinula boryana</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático	38

ABTS.

Figura 14. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-5 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 39

Figura 15. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-5 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 39

Figura 16. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 40

Figura 17. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 40

Figura 18. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 41

Figura 19. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 41

Figura 20. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 42

Figura 21. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 42

Figura 22. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 43

Figura 23. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 43

Figura 24. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	44
Figura 25. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	44
Figura 26. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	45
Figura 27. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	45
Figura 28. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-98 de <i>Pleurotus</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	46
Figura 29. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-98 de <i>Pleurotus</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	46
Figura 30. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-98 de <i>Pleurotus</i> sp. En medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	47
Figura 31. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-194 de <i>Pleurotus</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	47
Figura 32. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-194 de <i>Pleurotus</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	48
Figura 33. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-194 de <i>Pleurotus</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	48
Figura 34. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-205 de <i>Ganoderma lucidum</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	49

Figura 35. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-205 de <i>Ganoderma lucidum</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	49
Figura 36. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-205 de <i>Ganoderma lucidum</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	50
Figura 37. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-250 de <i>Coprinopsis</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	50
Figura 38. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-250 de <i>Coprinopsis</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	51
Figura 39. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-250 de <i>Coprinopsis</i> sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	51
Figura 40. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	52
Figura 41. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	52
Figura 42. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.	53
Figura 43. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-267 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.	53
Figura 44. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-267 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.	54
Figura 45. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-267 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático	54

guayacol.

- Figura 46.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 55
- Figura 47.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 55
- Figura 48.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 56
- Figura 49.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-389 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 56
- Figura 50.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-389 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 57
- Figura 51.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-389 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 57
- Figura 52.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-476 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 58
- Figura 53.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-476 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 58
- Figura 54.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-476 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 59
- Figura 55.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-492 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS. 59

- Figura 56.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-492 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP. 60
- Figura 57.** Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-492 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol. 60
- Figura 58.** Cepas del género *Pleurotus* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A1: CP-30 (*Pleurotus levis*) con un halo intenso de color por la oxidación de ABTS. A-2: CP-30 con un halo intenso de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-30 con un halo de color por la oxidación de guayacol, el recuadro muestra el reverso de la placa. B-1: CP-194 (*Pleurotus* sp.) con un halo intenso de color por la oxidación de ABTS. B-2: CP-194 con un halo de color menor al de CP-30 por la oxidación de DMP. B-3: CP-253 con poca coloración por la oxidación de guayacol. C1: CP-253 (*Pleurotus djamor*) con un halo de color por la oxidación de ABTS solo un poco mayor al crecimiento micelial. C-2: CP-253 con un halo de color por la oxidación de DMP. C-3: CP-253 con poca coloración por la oxidación de guayacol, el recuadro muestra el reverso de la placa. 61
- Figura 59.** Cepas del género *Lentinula* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A-1: CP-5 (*Lentinula boryana*) con un halo de color por la oxidación de ABTS. A-2: CP-5 con un halo de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-5 con un halo de color por la oxidación de guayacol. B-1: CP-7 (*Lentinula edodes*) con un halo de color tenue por la oxidación de ABTS. B-2: CP-7 con un halo de color tenue por la oxidación de DMP. B-3: CP-7 sin presentar coloración en presencia de guayacol. 62
- Figura 60.** Cepa del género *Coprinopsis* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A-1: CP-520 (*Coprinopsis* sp.) con un halo de color intenso por la oxidación de ABTS. A-2: CP-250 con un halo de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-250 con un halo de color por la oxidación de guayacol. 63
- Figura 61.** Cepas de *Ganoderma lucidum* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubada a 22°-26°C. A-1: CP-476 (*Ganoderma* 63

lucidum) con un halo de color por la oxidación de ABTS. A-2: CP-476 con un halo de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-476 con un halo de color por la oxidación de guayacol.

Figura 62. Cepas de *Pleurotus* a seis días de cultivo en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A-1: CP-98 (*Pleurotus* sp.) con un halo de color tenue por la oxidación de ABTS. A-2: CP-98 con un halo de color pequeño y tenue por la oxidación de DMP. A-3: CP-98 sin colorear el medio adicionado con guayacol. B-1: CP-18 (*Pleurotus cystidiosus*.) con poca coloración del medio por la oxidación de ABTS. B-2: CP-18 sin colorear el medio adicionado con DMP. B-3: CP-18 sin colorear el medio adicionado con guayacol. 64

Figura 63. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 67

Figura 64. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 68

Figura 65. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 68

Figura 66. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-98 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 69

Figura 67. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-194 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 69

Figura 68. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-205 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 70

Figura 69. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 70

Figura 70. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 71

Figura 71. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarium* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. 71

Figura 72. Picos máximos de actividad de lacasas de cepas de hongos comestibles crecidas en medio de cultivo sumergido (EMB) a 25°C. 77

Figura 73. <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 a los 3 días de crecimiento en medio de cultivo EMA. A: Control (sin la adición de antraceno). B: Tratamiento (con la adición de 0.1 g de antraceno).	82
Figura 74. Obtención de muestra en Tiempo 0 (6 horas), para evaluar actividad de lacasas. A: CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio de cultivo EMA sin antraceno y con ABTS. B: Control negativo en medio EMA adicionado con antraceno.	83
Figura 75. Observación microscópica de hifas creciendo sin inhibición en presencia de antraceno. A y B: CP-50 creciendo sobre fragmentos de antraceno, aumento 40 X.	86
Figura 76. Crecimiento micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia de antraceno a diferentes concentraciones sobre medio EMA.	87
Figura 77. Diferentes etapas del crecimiento de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre antraceno (A1-A3) Se muestra el crecimiento de la cepa CP-50 en presencia de antraceno, en donde se aprecia el estímulo del compuesto sobre el desarrollo de las hifas, en comparación al control (A4). B1-B4) La cepa CP-50 alcanzó el borde del antraceno y se notó una delimitación muy clara entre ambos. C1-C3) CP-50 sobrecreciendo antraceno y mostrando micelio de mejor apariencia que el control (C4).	89
Figura 78. CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio EMA adicionado con 0.1 g de antraceno. A-1: medio sin ABTS, en el tiempo 2. A-2: medio con ABTS 0.5 mM, en el tiempo 2. B-1: Medio sin ABTS en el tiempo 3. B-2: medio con ABTS 0.5 mM, en el tiempo 3.	90
Figura 79. <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio EMA adicionado con ABTS 0.5 mM. A: en ausencia de antraceno. B: en presencia de 0.1 g de antraceno.	90
Figura 80. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia de antraceno y evaluada con ABTS.	92
Figura 81. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia de antraceno y evaluada con DMP.	93
Figura 82. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia de antraceno y evaluada con guayacol.	93
Figura 83. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia de antraceno y evaluada con syringaldazina.	94
Figura 84. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en	96

medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con ABTS.	
Figura 85. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con DMP.	96
Figura 86. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con guayacol.	96
Figura 87. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con syringaldazina.	97
Figura 88. Actividad de lacasas del micelio en contacto con el antraceno y el micelio que se encontraba en el lado opuesto al antraceno (control), de una misma colonia de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , medio EMA, 20°-26°C.	99
Figura 89. Actividad de lacasas del micelio sobrecreciendo en antraceno y del micelio que se encontraba en el lado opuesto al antraceno, de una misma colonia, de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , medio EMA, 20°-26°C.	99
Figura 90. Área de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia y ausencia de antraceno, en los tres tiempos evaluados. Medio EMA, 20°-26°C.	101
Figura 91. Área de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia y ausencia de antraceno en los tres tiempos evaluados. Crecida en medio EMA suplementado con ABTS 0.5 mM, 20°-26°C.	101
Figura 92. Producción de proteína por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia y ausencia de antraceno. Medio EMA, 20°-26° C.	102
Figura 93. Producción de proteína por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia y ausencia de antraceno. Medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26° C.	102
Figura 94. Parámetros de desarrollo de CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia de antraceno, medio EMA, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.	110
Figura 95. Parámetros de desarrollo de CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en ausencia de antraceno, medio EMA, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.	111
Figura 96. Parámetros de desarrollo de CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia de antraceno, medio EMA adicionado con ABTS 0.5 mM, 20°-26°C. La actividad de lacasas	112

fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.

Figura 97. Parámetros de desarrollo de CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en ausencia de antraceno, medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos diferentes. 113

Figura 98. Esquema de problematización de la estrategia para el uso del hongo *Pleurotus ostreatus* en biorremediación de suelos agrícolas contaminados por hidrocarburos. 120

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos generales reportados para la remediación de suelos contaminados.	7
Cuadro 2. Clasificación de las tecnologías de biorremediación y tipos de técnicas más comunes.	8
Cuadro 3. Microorganismos reportados como degradadores de sustancias tóxicas.	10
Cuadro 4. Cepas de hongos comestibles utilizadas en el presente estudio.	31
Cuadro 5. Valores de pH del medio de cultivo adicionado con diferentes sustratos enzimáticos (temperatura: 24.2°-24.7°C) antes y después de su colonización por el micelio de los hongos comestibles estudiados.	65
Cuadro 6. Actividad de lacasas de hongos comestibles obtenida por métodos cualitativos y cuantitativos.	73
Cuadro 7. Actividad de lacasas de hongos del género <i>Pleurotus</i> reportada en la literatura.	75
Cuadro 8. Actividad de lacasas del género <i>Ganoderma</i> .	75
Cuadro 9. Actividad de lacasas del género <i>Lentinula</i> .	76
Cuadro 10. Muestras tomadas para la evaluación de lacasas en diferentes tiempos.	84
Cuadro 11. Concentración de reactivos necesarios en la elaborar la curva de calibración para proteínas.	86
Cuadro 12. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato ABTS.	91
Cuadro 13. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato DMP.	91
Cuadro 14. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato guayacol.	92
Cuadro 15. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato syringaldazina.	92
Cuadro 16. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> evaluada con el sustrato enzimático ABTS en medio de cultivo adicionado con ABTS.	95
Cuadro 17. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> evaluada con el sustrato enzimático DMP en medio de cultivo adicionado con ABTS.	95
Cuadro 18. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> evaluada con el sustrato enzimático guayacol en medio de cultivo adicionado con ABTS.	95
Cuadro 19. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> evaluada con el sustrato enzimático syringaldazina en medio de cultivo adicionado con ABTS.	95

Cuadro 20. Actividad de lacasas observadas en dos zonas distintas de una colonia de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el momento del contacto con el antraceno, medio EMA, 20°-26°C.	98
Cuadro 21. Actividad de lacasas observadas en dos zonas distintas de una colonia de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el momento de sobrecrecer en antraceno, medio EMA, 20°-26°C.	98
Cuadro 22. Área micelial de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en presencia y ausencia de antraceno en los diferentes tiempos evaluados, medio EMA, 20°-26°C.	100
Cuadro 23. Área micelial evaluada en el crecimiento de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio EMA suplementado con ABTS 0.5 Mm, 20°-26°C.	100
Cuadro 24. Producción de proteína por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> control, medio EMA, 20°-26°C.	103
Cuadro 25. Producción de proteína por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia de antraceno, medio EMA, 20°-26°C.	104
Cuadro 26. Producción de proteína por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> control, medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26°C.	104
Cuadro 27. Producción de proteína por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecida en presencia de antraceno, medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26°C.	104
Cuadro 28. Concentración máxima de diversos HAPs reportada para petróleo crudo.	109

PARTE I: MARCO CONCEPTUAL

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Los hongos comestibles

Los hongos son organismos unicelulares o multicelulares, que viven fijos a un sustrato y que mientras están vivos no cesan de crecer. Se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente y sobre una gran diversidad de sustratos. Sus compartimentos hifales tienen una pared formada por quitina, su desarrollo es a través de estructuras filamentosas llamadas hifas que, en su conjunto, se llaman micelio.

Su alimentación es de tipo heterótrofa, ya que no tienen clorofila y por lo tanto no realizan fotosíntesis. Cuentan con un sistema de digestión externa, es decir, secretan enzimas extracelulares para degradar los sustratos y se nutren por la absorción. Dependiendo del sustrato donde crecen los hongos pueden ser saprófitos cuando se alimentan de materiales en descomposición, parásitos cuando se alimentan de otros seres vivos y simbiotes cuando viven en asociación con otros organismos vivos y se benefician mutuamente.

Los hongos se reproducen de manera sexual y asexual. La reproducción asexual se lleva a cabo a través de hifas haploides que originan esporas por medio de la mitosis, llamadas conidias y oidias. La reproducción sexual consiste en la unión de dos hifas haploides compatibles que dan lugar a hifas dicarióticas y a su vez a esporas en estructuras tipo basidio (Figura 1). El proceso se lleva a cabo en tres fases principales: La plasmogamia con la fusión de los protoplastos, con lo que dos núcleos diferentes se encuentran en el mismo citoplasma. La kariogamia o fusión de los núcleos. Y la meiosis, en donde sucede una división que da lugar a núcleos haploides (Chang y Miles, 2004).

El reino Fungi se divide según Whittaker en dos grupos o filos: Myxomycota o mohos del légamo, y Eumycota u hongos verdaderos. En el grupo de los Eumycota están reportados cerca de 80,000 especies en las clases: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota*. La clase Basidiomycota (hongos que producen basidios con basidiosporas) contiene a la mayoría

de los hongos comestibles, estos presentan hifas septadas. Son pluricelulares. Sus cuerpos fructíferos constan de un pie o estípote y de un sombrero, en donde se encuentran las láminas que a su vez contienen a los basidios donde se producen las basidiosporas (Vilée, 1988).

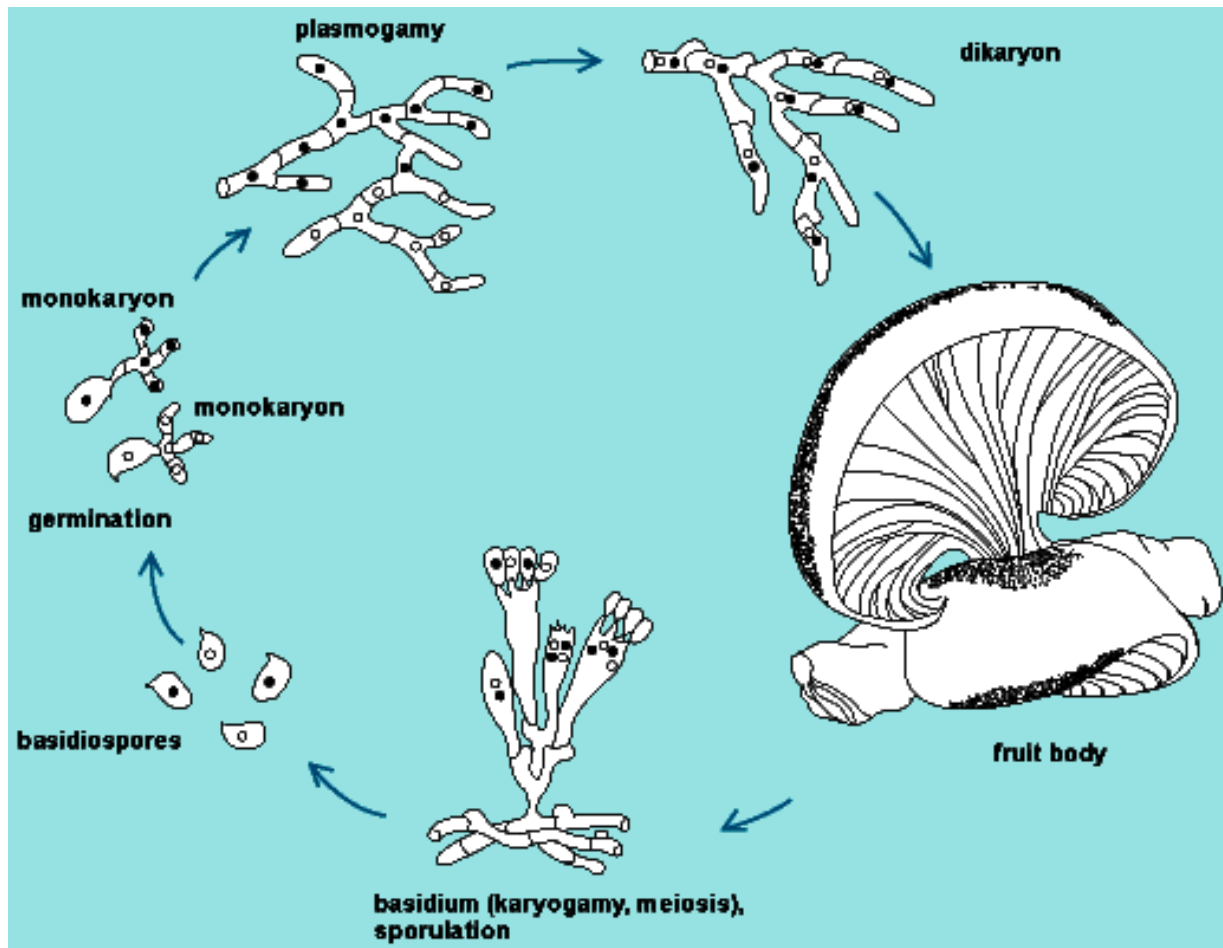


Figura 1. Ciclo de vida de los basidiomicetos superiores (*Pleurotus ostreatus*) (Martínez-Carrera, 1998).

Los hongos comestibles han sido apreciados desde hace varios siglos por sus incomparables características alimentarias, sus propiedades nutricionales y su excelente sabor, al igual que por su singular capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con efecto medicinal, entre los que se citan: antibióticos, antitumorales, antiinflamatorios, anticolesterolémicos y antioxidantes.

En general se calcula que existen cerca de 1.5 millones de especies de hongos de los cuales 14,000 producen cuerpos fructíferos de suficiente tamaño como para ser considerados macromicetos, de estos casi el 50% (cerca de 7,000 especies) se considera que poseen algún grado de comestibilidad. No obstante, hasta hoy en día solo doscientas de ellas se cultivan experimentalmente, de los cuales cerca de cien son rentables y alrededor de sesenta se encuentran en el mercado, de estas últimas, solo diez han alcanzado la escala industrial de producción (Chang y Miles, 2004). A nivel mundial la producción de hongos representa la mayor industria basada en fermentación sólida (Lau *et al.*, 2003). En Latinoamérica, el cultivo de hongos comestibles fue introducido en 1933 desde Europa y la primera empresa importante en México se fundó en 1949 (Martínez-Carrera, 2002; Martínez-Carrera y López-Martínez, 2010). Entre los hongos comercialmente más importantes se incluyen:

1. Los “champiñones” (*Agaricus*), conocidos también como “hongo blanco”, “champiñón” u “hongo de botón”, son los hongos con la mayor producción mundial y con los avances tecnológicos más importantes para su cultivo, especialmente difundido en países de occidente.
2. Las “setas” (*Pleurotus*), denominadas también con los nombres de “oreja” u “hongo ostra”, son hongos relativamente fáciles y rápidos de cultivar y pueden crecer sobre una gran variedad de sustratos. Existen varias especies cultivables, entre las que se encuentran: *P. pulmonarius*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus* y *P. djamor*.
3. El “shiitake” (*Lentinula edodes*), conocido como “el hongo negro de los bosques”, “hiang-gu” para los chinos y “shiitake” para los japoneses, es uno de los hongos comestibles más estimados en el oriente de Asia. Fue cultivado en China sobre troncos de árboles muertos. El primer documento escrito que alude al cultivo del shiitake se remonta a Wu Sang Kwuang, quien vivió en los tiempos de la dinastía Song (960-1127). La palabra “Shiitake” viene de Shii = castaño, take = hongo; hongo del castaño (también crece sobre otras especies), debido al sustrato silvestre. Las especies de árboles en las que se puede cultivar el hongo son principalmente las que pertenecen a los géneros: *Quercus* y *Cyclobalanopsis* (encinos), *Castanea* (castaños), *Carpinus* (carpes), y *Castanopsis* (castaño japonés o shii), también pueden crecer en sustratos a base de aserrín. Se le asocia con propiedades medicinales importantes.

4. El “reishi” (*Ganoderma*), conocido también como “ling-chi” o “panacea poliporo”, es un hongo leñoso, consumido principalmente en infusiones, aunque en algunos pueblos también se consume el hongo en las primeras etapas de su desarrollo, actualmente es el hongo al que se le atribuyen mayores propiedades medicinales.
5. El “maitake” (*Grifola*). En Japón se le conoce como “hongo danzante”, en China como “flor gris de los árboles”, en Norteamérica como “gallina de la madera” u “hongo cabeza de oveja”. Se trata de un hongo poliporo grande y carnoso (15-60 cm, 1.87-3.37 kg). En la naturaleza se encuentran creciendo sobre el pasto o cerca de la base de los árboles, en troncos muertos y maderas duras. Al igual que *Lentinula* y *Ganoderma* se le considera como uno de los hongos más importantes por sus propiedades medicinales.

La mayor parte de estos hongos poseen, además, gran importancia etnomicológica, ya que son muy estimados por los indígenas de diversos grupos étnicos y, en general, por los campesinos de las zonas donde se desarrollan los hongos en abundancia, en el caso de México, son principalmente la zona centro del país y los bosques húmedos de las regiones templadas.

1.2. La contaminación por hidrocarburos del petróleo, un problema global

Como es sabido el petróleo constituye la principal fuente de energía no renovable de la sociedad contemporánea y la materia prima para la elaboración de un sin número de artículos y productos químicos, por lo que se convirtió en el agente más importante del impulso económico y social de países desarrollados y subdesarrollados, tan solo en el año 2006 se produjeron 3,816 toneladas métricas.

Este importante elemento contiene grandes cantidades de hidrocarburos, principalmente de tipos parafínicos, nafténicos y aromáticos, en una proporción constitutiva de 82-85% de C, 12-15% de H, cerca del 3% de azufre, oxígeno y nitrógeno, y contiene además varios elementos metálicos, con variaciones en la concentración de estos últimos, de acuerdo al sitio en donde se ha formado el petróleo (Jiménez, 2001; Miller, 2002).

Los hidrocarburos aromáticos, tales como el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, que se encuentran predominantemente en las fracciones ligeras del petróleo, son compuestos

utilizados ampliamente en la industria como solventes, relativamente solubles en agua por lo que pueden ser transportados fácilmente y llegando a acceder a suelos y aguas subterráneas. Así mismo, pueden volatilizarse a temperatura ambiente por lo que se convierten además en una fuente de contaminación aérea importante (Baker y Herson, 1998). Aún más significativos, por la toxicidad que conllevan y sus características recalcitrantes, se encuentran en la composición del petróleo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que constituyen además, un grupo de más de cien sustancias químicas diferentes formadas de dos o más anillos de benceno (Wade 1993; Mougin, 2002). El naftaleno (C₁₀ H₈), por ejemplo, es uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos más comunes en suelos contaminados, es el más simple y consiste de dos anillos de benceno fusionados. Por su parte, los compuestos antraceno y fenantreno están formados de tres anillos de benceno y entre los hidrocarburos aromáticos policíclicos superiores se pueden mencionar al pireno, benzopireno y dibenzopireno.

Los compuestos como el petróleo y sus derivados son sustancias frecuentemente implicadas en problemas ambientales, agrícolas y de salud, que han causado pérdidas económicas y ecológicas en nuestro país y aunque, algunos hidrocarburos formados por n-alcenos se pueden degradar fácilmente a través de la biorremediación que realizan microorganismos autóctonos, es bastante difícil la restauración de sitios altamente contaminados por hidrocarburos poliaromáticos.

La contaminación por derrames de petróleo afecta las funciones ecológicas de los suelos y subsuelos, tales como la recarga y protección de mantos acuíferos, los ciclos biogeoquímicos y las cadenas tróficas, altera las propiedades físicas del suelo (cambios en la estructura debido a la ruptura de los agregados y aumento de la retención del agua en la capa superficial) y químicas (aumento del carbono orgánico con la consecuente disminución del pH, aumento del manganeso y del hierro intercambiable y aumento del fósforo disponible) (SEMARNAT, 2007). Es relevante también el hecho de que muchos de los compuestos poliaromáticos pueden permanecer durante un tiempo considerable en el suelo y acumularse a través de las cadenas alimenticias, muchos tienen efectos teratogénicos y cancerígenos.

1.3. Remediación y biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo

Los suelos, como base de la producción de alimentos y fibras, se caracterizan por tener tanto presencia de nutrientes como una estructura física que sustenta la vida de los organismos. El suelo, considerado como organismo vivo, dinámico y tridimensional (tiene dimensiones de longitud, ancho y profundidad), está sujeto a los procesos y las etapas de la vida. Un suelo nace, crece y puede llegar a morir, todos los suelos están obligados a cambiar a través del tiempo. Cabe mencionar que la característica más sobresaliente de los suelos es posiblemente su gran capacidad de transformar y reciclar las sustancias y los materiales que se depositan en él, con ayuda de los microorganismos y de las condiciones físicas adecuadas. Sin embargo, a pesar de la gran actividad purificadora que pueden presentar los suelos, la actividad humana ha sobrepasado en muchos casos la capacidad de degradación de los mismos, los vertidos de forma permanente e incrementada de compuestos xenobióticos, hacen necesaria la toma de acciones remediadoras que permitan mantener el estado de equilibrio y salud del ambiente. Cada país tiene organizaciones responsables de evaluar el daño y las concentraciones máximas permisibles en los diferentes ambientes, entre los organismos reguladores más importantes se puede mencionar a la EPA (Environmental Protection Agency) de los Estados Unidos.

A la evaluación de los riesgos de un accidente ambiental, siguen las medidas de mitigación inmediata, tales como la clausura de pozos de extracción de agua contaminados, la colección de aceite crudo derramado en cuerpos de agua y la excavación de zanjas o introducción de cortinas para evitar la dispersión. No obstante, normalmente quedan remanentes en la estructura del suelo o disueltos en el agua, los cuales requieren de la aplicación de tratamientos de remediación más específicos, para lo cual existen diversas tecnologías de remediación disponibles comercialmente, las que han demostrado mayor nivel de eficiencia se encuentran referidas en la Cuadro 1. En su mayoría, se trata de procesos físicos y químicos de atenuación no destructiva en donde los compuestos contaminantes se conservan aún cuando se ha cambiado su contexto en el medio.

Cuadro 1. Métodos generales reportados para la remediación de suelos contaminados.

Tecnologías de remediación <i>in situ</i>	Tecnologías de remediación <i>ex situ</i>
Atenuación natural	Confinamiento en contenedores y sitios especiales
Extracción al vacío de compuestos volátiles	Solidificación/estabilización con mezclas suelo-cemento o microencapsulación
Arrastre por inyección de aire	Tratamiento térmico
Vitrificación por alta corriente eléctrica	Incorporación de suelo contaminado a materiales asfálticos
Filtración a través de carbón activado	Lavado de suelo con solventes orgánicos
Desorción térmica por aplicación de temperatura	Incineración para la destrucción de residuos peligrosos en altas concentraciones
Arrastre de vapor a través de pozos	Tratamiento de aguas subterráneas

Fuente: Ibbotson *et al.*, 1989; Flores *et al.*, 2004.

La necesidad de desarrollar métodos más eficientes para remediar los suelos contaminados propició el surgimiento de tecnologías más precisas, como la biorremediación, basada en los procesos enzimáticos que llevan a cabo los microorganismos para transformar los compuestos tóxicos que se encuentran en el ambiente.

La biorremediación es una de las mejores técnicas que pueden aplicarse para la eliminación de tóxicos de forma natural y la recuperación de ambientes generalmente dañados por alguna actividad humana. Usualmente es mucho menos costosa que las tecnologías alternativas y tiene la importante característica de transformar los contaminantes en sustancias más simples o de menor toxicidad o incluso, puede llegar a mineralizarlos completamente en lugar de simplemente transferirlos a una fase diferente o a otra localidad (Baker y Herson, 1994).

La clasificación de los procesos de biorremediación es similar a la de las tecnologías de remediación clásicas: tecnologías *in situ* y tecnologías *ex situ*. En el Cuadro 2 se muestran los procesos de biorremediación más frecuentemente utilizados.

La degradación de hidrocarburos en suelo ha sido estimada por Ruda *et al.* (2004) en tasas de 0.02-0.4 g de hidrocarburos/kg suelo/día, con una población microbiana aproximada de 10^5 unidades formadoras de colonias/g suelo, con variaciones dependiendo de las características del suelo, el clima, la micro y macroflora y la calidad y cantidad de los hidrocarburos presentes.

Sin embargo, en un compuesto tan diverso como lo es el petróleo, no todos sus componentes se degradan de igual manera. Es así que los hidrocarburos alifáticos lo hacen más rápidamente que los aromáticos, los de cadenas lineales más fácilmente que los ramificados y los saturados más que los insaturados (Baker y Herson, 1998).

Cuadro 2. Clasificación de las tecnologías de biorremediación y tipos de técnicas más comunes.

TECNOLOGÍA DE BIORREMEDIACIÓN	CARACTERÍSTICAS
<i>Ex situ</i>	
Bioreactores	El proceso se lleva a cabo en un contenedor o reactor, comúnmente útil para líquidos o lodos
Labranza (Landfarming)	Sistema de tratamiento en fase sólida. Útil para suelos (opcional <i>ex situ</i> o <i>in situ</i>)
Compostaje	Proceso aeróbico y termofílico en donde se mezcla el material con un agente que da volumen. Se pueden aplicar en pilas estáticas, pilas aireadas, o en reactores de proceso continuo
<i>In situ</i>	
Bioventilación	Inyección de aire en suelos para estimular el crecimiento y la actividad microbiana
Bioestimulación	Estimulación del desarrollo de microorganismos nativos en suelo o agua con la adición de nutrientes
Bioaumentación	Adición de microorganismos
Biofiltros	Utilización de columnas laminares microbianas para tratar las emisiones de vapores
Fitorremediación	Utilización de plantas

Fuente: Baker y Herson, 1994.

Los principales organismos responsables de la transformación química de los contaminantes son las bacterias aeróbicas, incluyendo los actinomicetos y las cianobacterias, las bacterias anaeróbicas, los hongos y algunas algas (Riser-Roberts, 1992). El mecanismo por el cual llevan a cabo la degradación de los compuestos orgánicos, incluye la producción de enzimas y la participación en procesos metabólicos, con transferencia de electrones desde un electrón

donador hasta un compuesto aceptor de electrones. El principal y más importante aceptor de electrones por su alto rendimiento energético es el oxígeno, implicado en las reacciones oxidativas aeróbicas. Conforme el oxígeno disponible disminuye en concentración, los microorganismos anaeróbicos pueden participar en la oxidación y transformación del compuesto utilizando otros aceptores de electrones, tales como nitrato, manganeso, hierro, sulfato y dióxido de carbono (Levin y Gealt, 1997).

Específicamente, en la biodegradación de moléculas aromáticas del petróleo se involucran dos pasos: la activación de los anillos y el rompimiento de los mismos. Estos compuestos se degradan entonces a formas ácidas que pueden ser utilizadas por los microorganismos, como en el caso del fumarato o el acetoacetato que son introducidos al ciclo de Krebs, obteniéndose al final de la reacción la modificación del compuesto inicial hasta la formación de dióxido de carbono y agua. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se degradan, rompiendo y procesando un anillo a la vez (Levin y Gealt, 1997).

A pesar de las eminentes ventajas de la biorremediación, debe señalarse que también tiene algunas limitaciones, tales como largos períodos de restauración, inhibición de la actividad microbiana por la contaminación y la falta de efectividad en suelos de baja permeabilidad, o cuando la contaminación alcanza niveles de mayor profundidad. Algunos contaminantes específicos (cadmio, plomo, mercurio, materiales radioactivos o corrosivos) no pueden tratarse por biorremediación, ya que la mayoría de los microorganismos no los absorben fácilmente, pueden bioacumularlos en las cadenas tróficas, o incluso pueden generar subproductos con mayor toxicidad a la inicial (Baker y Herson, 1998).

Debido a la complejidad de muchos de los compuestos contaminantes y a la diversidad enzimática que se requiere para degradarlos es común que la biodegradación no se pueda llevar a cabo por un solo microorganismo, sino a través de consorcios microbianos en un proceso denominado cometabolismo o co-oxidación (Baker y Herson, 1998). Las bacterias, las levaduras y la mayor parte de los hongos filamentosos (no así los hongos comestibles) muestran un decremento en su habilidad para degradar compuestos conforme aumenta la longitud de la cadena de carbonos. En el caso de los hidrocarburos poliaromáticos, la degradación microbiana es inversamente proporcional al número de anillos que contienen. Los hongos comestibles por

los sistemas enzimáticos que poseen logran degradar compuestos que otros microorganismos no pueden.

Por otro lado, algunos microorganismos pueden producir sustancias surfactantes, las que no sirven para degradar a los contaminantes pero ayudan a incrementar la movilidad y la biodisponibilidad de los mismos, son especialmente útiles en los suelos contaminados con petróleo, precisamente por el hecho de que muchos de los compuestos, como los HAPs, se adhieren fuertemente a las partículas del suelo (Baker y Herson, 1998).

Cuadro 3. Microorganismos reportados como degradadores de sustancias tóxicas.

Microorganismos degradadores / métodos empleados	Compuesto degradado	Referencia
Bacterias (15% cepas aisladas presentaron capacidad degradadora)	Tolueno	Juteau <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Trichoderma</i> (de rizósfera)	HTP (hidrocarburos totales del petróleo)	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2002
Bacterias nativas (20% de degradación): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Pseudomonas cepacea</i>	Fenantreno	Chávez-Gómez <i>et al.</i> , 2003
Hongos filamentosos nativos (35-50% de degradación): <i>Penicillium</i> sp., <i>Trichoderma viride</i> , <i>Alternaria tenuis</i> y <i>Aspergillus terreus</i>		
Hongos filamentosos nativos: <i>Coniothyrium</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.	HTP (26.5% y 27.5%)	Potin <i>et al.</i> , 2004
Microbiota nativa/ bioestimulación (aprox. 95% de degradación)	HTP en lodos	Rojas-Avelizapa <i>et al.</i> , 2007
Bioaumentación*: <i>Rhizopus</i> sp. (36%), <i>Penicillium funiculosum</i> (30%), <i>Aspergillus sydowii</i> (17%)	HTP	Mancera-López <i>et al.</i> , 2008

*Incremento en la degradación comparado con el proceso de bioestimulación.

A partir de las primeras publicaciones de microorganismos biorremediadores (Zobell, 1946; Davis, 1956) los microorganismos han constituido el punto de partida de una gran cantidad

de estudios científicos en pro de la biorremediación. En el Cuadro 3 se reportan trabajos realizados con bacterias y hongos filamentosos en la degradación de petróleo.

Específicamente, la biodegradación de moléculas aromáticas del petróleo involucra dos pasos, la activación de los anillos y el rompimiento de los mismos, como se muestra en la Figura 2. Estos compuestos se degradan entonces a formas ácidas que pueden ser utilizadas por los microorganismos, como en el caso del fumarato o el acetoacetato que son introducidos al ciclo de Krebs, obteniéndose al final de la reacción, la modificación del compuesto inicial hasta la formación de dióxido de carbono y agua. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se degradan, rompiendo y procesando un anillo a la vez (Levin y Gealt, 1997). La reacción general del catabolismo de degradación se explica de la siguiente manera:

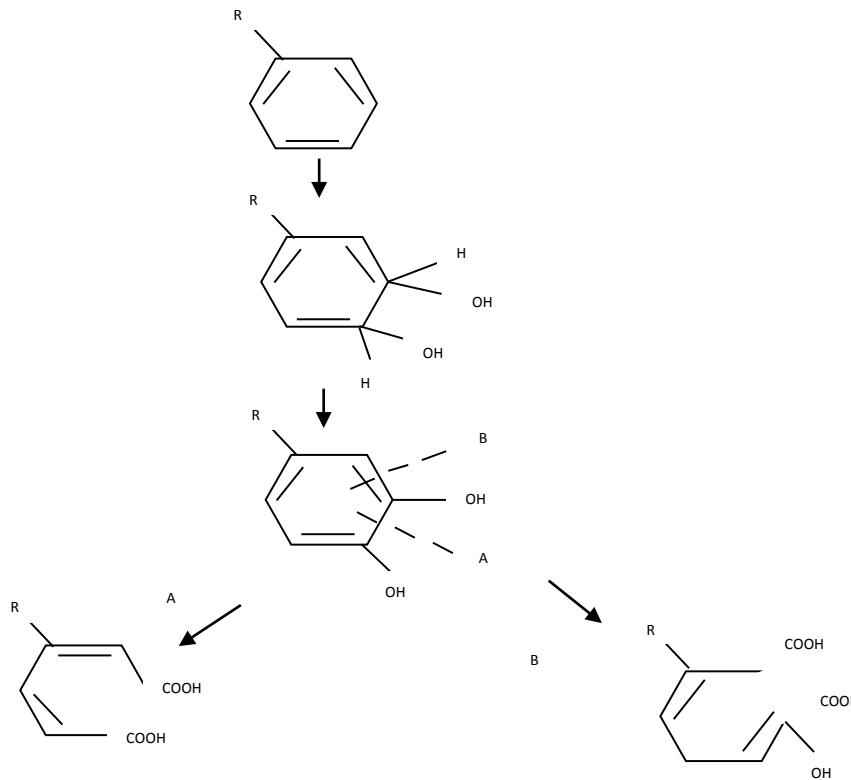
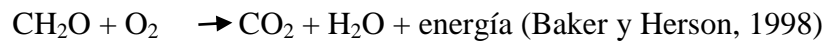


Figura 2. Etapas generales de la degradación de compuestos aromáticos del petróleo (Levin y Gealt, 1997).

1.4. La actividad enzimática de los hongos comestibles productores de lacasas

Los hongos comestibles se desarrollan directamente sobre los sustratos de cultivo de carácter lignocelulósico, secretando diversas exoenzimas, tales como: lacasas, manganeso peroxidasas (MnP) y lignino peroxidasas (LiP) (Collins *et al.*, 1996; Majcherczyk *et al.*, 1998; Gramss *et al.*, 1999; Novotny *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 1999; Baldrian *et al.*, 2000; Eggen y Sasek, 2002; Leonardi *et al.*, 2007).

Las enzimas lignolíticas despolimerizan la lignina, un compuesto complejo formado por muchos anillos aromáticos. En la Figura 3 se muestra el modelo para la lignina de coníferas formada por polimerización deshidrogenativa del alcohol coniferílico con las correspondientes unidades guayacilpropano formando diferentes tipos de subestructuras: 1) éter guayacilglicerol- β -arílico; 2) fenilcumarano; 3) pinorresinol; 4) éter difenílico; y 5) dibenzodioxocina. La estructura 1 es la más frecuente, ya que 50-60% de las unidades de la lignina están unidas por enlaces β -O-4. Mientras que 1-4 son estructuras diméricas, la estructura 5, recientemente descrita, es una estructura trimérica en la que los grupos OH de un bifenilo fenólico forman dos enlaces éter con los OH de los carbonos α y β de la cadena lateral de una tercera unidad (Del Río, 2005). La despolimerización de la lignina, así como de la celulosa, genera compuestos más simples que son entonces absorbidos por las hifas para su desarrollo y reproducción. También intervienen en diversos procesos del desarrollo de los hongos y la esporulación, la síntesis de melanina y otros pigmentos, y en procesos de patogénesis de plantas y animales (Kilaru *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2003; Cullen, 1997; Leonowicz *et al.*, 1999).

Debido al sistema multienzimático extracelular, los basidiomicetos (Fungi, Basidiomycota) son los únicos organismos conocidos capaces de mineralizar eficientemente la lignina para convertirla en CO₂ y H₂O, como parte fundamental del ciclo del carbono en la tierra (Crawford, 1981; Carlile y Watkinson, 1996).

El sistema enzimático de las lacasas es posiblemente uno de los más estudiados. Estas enzimas fueron reportadas por primera vez en el año 1885 e identificadas a partir de árboles, en 1896 las encontraron en hongos y a partir de entonces se ha incrementado el interés y el conocimiento de estas enzimas, descubriendo cada vez más aplicaciones y usos para ellas, ahora

se sabe que se encuentran en plantas, en hongos y en unas cuantas bacterias (Desai y Nityanand, 2011).

Las lacasas (EC.1.10.3.2: *p*-difenol-dioxígeno oxidoreductasas) son biopolímeros que pertenecen al grupo de enzimas llamadas oxidasas polifenólicas (D'Acunzo *et al.*, 2002). Se les conoce también como enzimas multicobre azul, ya que pueden unir cuatro moléculas de cobre en dos sitios altamente conservados, un dominio monocobre y un dominio tricobre. La disponibilidad de cobre en el medio, es indispensable en la actividad enzimática de las lacasas. Así mismo, la suministración de sulfato de cobre puede incrementar la actividad de lacasas en varios hongos comestibles (Baldrian y Gabriel, 2002a; Kajita *et al.*, 2004; Kilaru *et al.*, 2006a; Palmieri *et al.*, 2000).

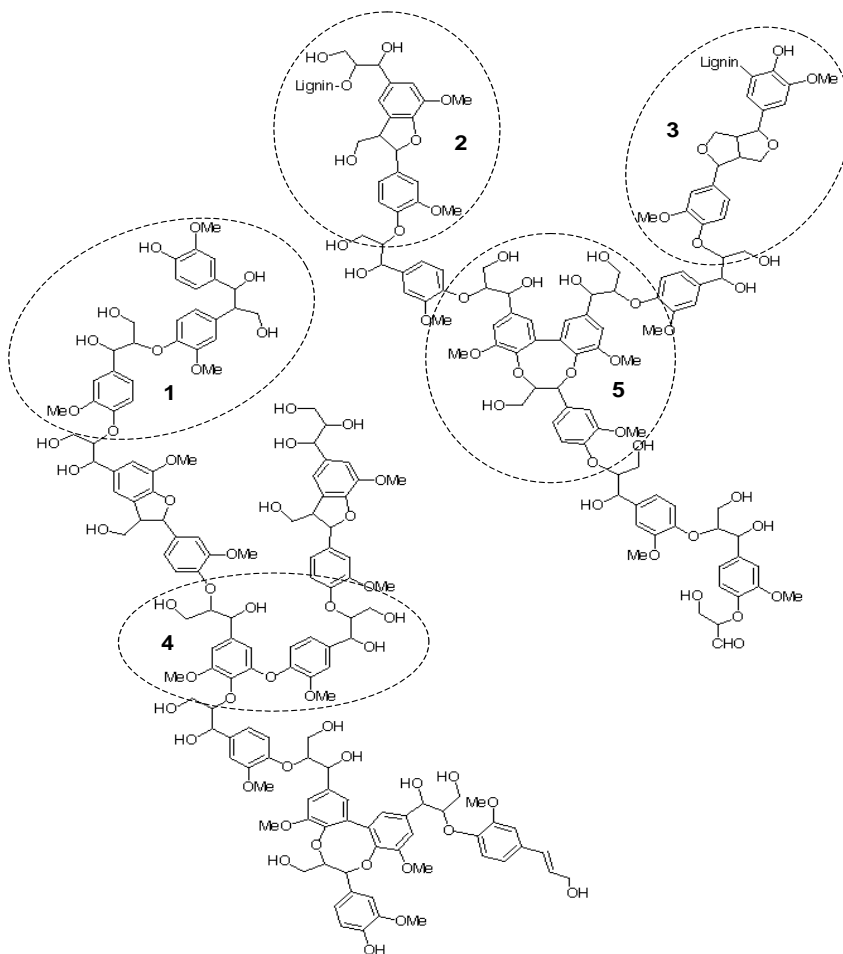


Figura 3. Estructura química de la lignina (Del Río, 2005).

Al igual que la adición de sulfato de cobre, existen otros compuestos mediadores que se han utilizado recientemente, en particular en cultivos sumergidos. Tekere *et al.* (2001), demostraron la producción de lacasas con varias especies de hongos pertenecientes al género *Trametes*, así como con *Lentinula velutinus*, *Pycnoporus sanguineus* y otros hongos, en presencia de cycloheximida como inductor. Tzialla *et al.* (2009), utilizaron 2,5-xilidina y guayacol en cultivos de *Trametes hirsuta*, *T. versicolor* y *B. cinerea*. Cordi *et al.* (2007) emplearon 2,5-xilidina en *T. versicolor* y Gómez *et al.* (2005) estimularon la producción de lacasas de *Lentinula edodes* con amonio. Otros inductores de la actividad de lacasas incluyen al alcohol veratril o la lignina (Desai y Nityanand, 2011; Cavallazi *et al.*, 2005; Valeriano *et al.*, 2009). También se favorece la activación utilizando medios limitados de ciertos nutrientes, tales como nitrógeno, carbono o sulfuro. Estos factores, también pueden ser determinantes en la aparición de isoformas de las enzimas. Las isoformas son estructuras proteicas estrechamente relacionadas entre sí, pero con alguna variación en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, catalizan la misma reacción.

Muchos hongos ligninolíticos son capaces de producir isoformas de las lacasas a partir de los mismos o diferentes genes, que varían de acuerdo al sustrato en el que se encuentran (Desai y Nityanand, 2011; D'Souza-Ticlo *et al.*, 2009). Los sistemas ligninolíticos de los hongos de la pudrición blanca a los que pertenecen los basidiomicetos, se activan en su mayoría en la fase de producción de metabolitos secundarios. Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), reportaron 5 isoformas de lacasas para *Pycnoporus sanguineus*, cultivado en aserrín de pino, siendo la más abundante aquella de peso molecular de 68 KDa.

A la fecha se han purificado y caracterizado más de 100 lacasas, con longitudes que varían entre 516 y 567 aminoácidos. Las lacasas muestran tramos largos de secuencias conservadas con interrupciones de tramos cortos con más variaciones (Kilaru *et al.*, 2006b).

El estudio de la producción de lacasas ha sido motivo de atención para muchos trabajos de investigación, especialmente con hongos comestibles, se pueden mencionar la producción de lacasas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido (Baldrian y Gabriel, 2002a; Ramírez *et al.*, 2003), estudios de la actividad enzimática de xilanasas, celulasas y lacasas de *Trametes* sp., *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* (Márquez-Araque *et al.*, 2007; Bourbonnais *et al.*, 1995),

o la extracción a nivel de laboratorio de lacasas a partir de compost de residuos de cultivo de *Agaricus bisporus* (Trejo-Hernández *et al.*, 2001) o de *Lentinula polychrous* (Khammuang y Sarnthima, 2007), entre otros.

Las lacasas son posiblemente, las enzimas más prometedoras para reemplazar muchos de los procesos químicos convencionales ya que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Kunamneni, 2007). Actualmente, se encuentran ya algunas lacasas en el mercado para la producción de textiles, alimentos y otras industrias, y existen muchas aplicaciones potenciales para las lacasas, que incluyen: blanqueo de pulpa de papel, de colorantes textiles, en síntesis orgánicas, usos ambientales para degradar compuestos tóxicos, desarrollo y mejoramiento de procesos alimenticios y farmacéuticos y hasta en nanobiotecnología. Aportan ventajas adicionales, ya que consumen poca energía y son biodegradables, por lo que los procesos de biocatálisis con lacasas, pueden considerarse apropiados para desarrollar procesos industriales más eficientes, sustentables y ambientalmente amigables.

La revolución que han experimentado en los últimos tiempos las ciencias de la vida y la biotecnología han abierto nuevas posibilidades para dirigir la economía mundial hacia un desarrollo más sostenible y una mejor calidad de vida, en donde la biotecnología es parte fundamental de la nueva sociedad del conocimiento y en donde las prácticas de biorremediación tendrán mucho que aportar al desarrollo de nuestras sociedades.

II. ANTECEDENTES

2.1. La crisis de la industria petrolera y las implicaciones ambientales en México

A partir del siglo XX, el petróleo se ha convertido en un factor determinante para la economía de nuestro país a través del impulso que ha brindado a las finanzas públicas, a la industria, al desarrollo tecnológico, a la balanza comercial y a las relaciones con el exterior, hasta establecerse como un elemento clave para la seguridad nacional. Cerca del 88% de la energía primaria que se consume en México proviene del petróleo (INEGI, 2006). Es la principal fuente de insumos para generar energía eléctrica, permite la producción de combustibles para los sectores de transporte e industrial. Además, es materia prima de una gran cantidad de productos como telas, medicinas o variados objetos de plástico.

El país produjo en el 2006 más de 3 millones de barriles diarios de petróleo crudo, principalmente de tipo Maya o pesado (API de 21.57°), y en menor cantidad de los tipos Istmo o ligero (API de 33.44°) y Olmeca o superligero (API de 38.30°) (OPEC), contando además, con reservas de crudo por 12,352 millones de barriles, con las que ocupó el 14° lugar en el mundo, con ventas equivalentes al 10% del Producto Interno Bruto (Pemex, 2007). Petróleos Mexicanos (Pemex), es un organismo público descentralizado cuyas actividades abarcan la exploración y explotación de hidrocarburos, así como la producción, almacenamiento, distribución y comercialización de productos petrolíferos y petroquímicos. Petróleos Mexicanos está integrado por cuatro organismos subsidiarios que participan en 53 empresas o entidades con diversos objetivos, entre los que destacan: realizar y administrar inversiones estratégicas, hacer más eficiente la comercialización en el mercado internacional, aumentar la flexibilidad en el comercio exterior y reducir riesgos comerciales y de fletamento y participar en proyectos de exploración en otros países (Pemex, 2010).

Los cuatro organismos filiales de Pemex son: Pemex Exploración y Producción (PEP); Pemex Refinación (PR); Pemex Gas y Petroquímica Básica, y Pemex Petroquímica. Para la extracción y producción de petróleo crudo y gas natural cuenta con 174 plataformas marinas, 4,155 pozos en explotación, 301 campos en producción y más de 4,800 kilómetros de oleoductos y gaseoductos. Para la refinación del petróleo posee seis refinерías con capacidad de procesamiento primario de 1 millón 535 mil barriles diarios. Opera una red de oleoductos y

poliductos cercana a los 13,000 kilómetros que conecta a las refinerías con 79 terminales de abastecimiento y distribución. Opera 24 buques de flota mayor, 19 propios y cinco rentados, 93 embarcaciones menores y un dique seco. Para transporte terrestre de petrolíferos dispone de 3,575 autotanques y 530 carrotanques propios y tiene otorgadas 5,113 franquicias a igual número de estaciones de servicio, a la vez que cuenta con 55 de su propiedad. Aunado a esta división, existen el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), encargado de la investigación y el desarrollo en la materia y PMI Internacional, la comercializadora que exporta e importa crudos, petrolíferos y petroquímicos (Gil y Chacón, 2008). En la actualidad Petróleos Mexicanos es la empresa más grande de México y una de las diez petroleras más grandes del mundo, tanto en términos de activos, como de ingresos. Si se considera el nivel de reservas y su capacidad de extracción y refinación.

Pemex ofrece una gran cantidad de empleos directos e indirectos, contribuye aproximadamente con el 37% de los ingresos del sector público del país (INEGI, 2006). Por la nobleza de esta industria se pudiera pensar que el crecimiento de Pemex estuviera asegurado. Sin embargo, varios factores que han limitado su desarrollo. En primer término, los excesivos impuestos a la que está sujeta la empresa, ya que a raíz del descubrimiento del campo de Cantarell y de cara a la profunda crisis fiscal del Estado mexicano, la gran producción petrolera y el elevado volumen de las exportaciones de crudo se destinaron a la recaudación de ingresos fiscales para el gobierno federal. La contribución fiscal de Pemex alcanzó en 2006 más de 70 mil millones de dólares, lo que representó el 8% del PIB y alrededor del 40% de los ingresos fiscales del gobierno federal (Gil y Chacón, 2008; Höök, 2009). En segundo término, la disminución de las reservas nacionales de crudo, así como la poca inversión destinada a la exploración de nuevos pozos.

A nivel mundial se estima que la producción de petróleo pudiera encontrarse muy cercana al pico de Gubert (es decir al pico máximo de producción mundial de petróleo), ocasionando después de este la inminente disminución general del crudo. En México, en el 2008 Pemex extrajo 2.8 millones de barriles diarios, cerca de 9% menos de los 3.08 millones del 2007, reportándose el más rápido descenso de producción desde 1942. La problemática financiera de Pemex ha repercutido en la poca vigilancia e inversión para incrementar la seguridad de ductos y demás instalaciones que contribuyan a evitar derrames y contaminaciones accidentales. A partir

de la segunda mitad del siglo XX el petróleo crudo se ha extraído del pozo y se lleva directamente a las cisternas de los buques-tanque a través de los 4,441 km de oleoductos que Pemex tiene instalados en el país (INEGI, 2006).

A pesar de la disminución de las actividades petroleras en el país en los últimos años, debido a la disminución de las reservas naturales de este material, Pemex sigue siendo el responsable de importantes emergencias ambientales. Entre 1997 y 2001 causó el 57% de las emergencias ambientales con sustancias peligrosas (1,470 desastres ambientales), dos terceras partes de las emergencias fueron causadas por daño a ductos. En promedio, para el 2002 se reportaron 3.2 emergencias ambientales cada semana, de las cuales 2.1 ocurrieron en ductos afectando a muchos predios agrícolas (SEMARNAT, 2007). A la fecha siguen presentándose accidentes constantes por rompimiento de ductos.

Las causas de estos accidentes pudieran pensarse en razón a tres factores principales: el mal estado de los ductos de transporte por falta de mantenimiento o renovación (ya que la mayoría han cumplido o están por cumplir su tiempo de vida media que es de aproximadamente 30 años), los movimientos de placas tectónicas que ocasionan rompimientos y las cada vez más frecuentes tomas clandestinas de extracción de petróleo. A la fecha, la situación de los ductos es la misma y se siguen presentando fugas y explosiones como la ocurrida en la comunidad agrícola de San Martín Texmelucan, Puebla, el 19 de diciembre del 2010.

Del 2000 al 2007 se presentaron un promedio de alrededor de 150 tomas clandestinas (Figura 4). Del total, 136 se ubicaron en ductos de Pemex Refinación (PR) (Figura 5), 9 en oleoductos de Pemex Exploración y Producción (PEP) y 3 en gaseoductos de Pemex Gas y Petroquímica Básica (PGPB).

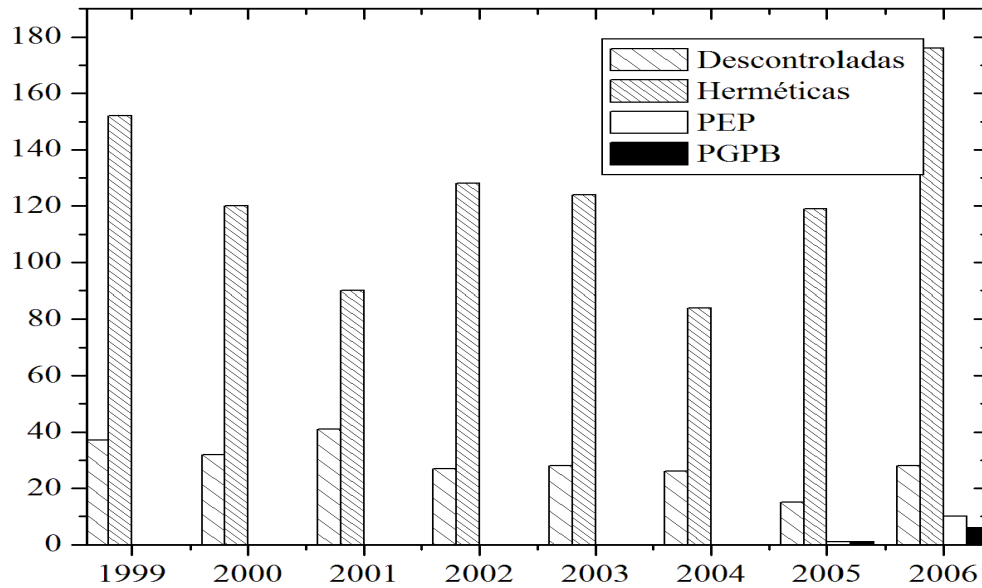


Figura 4. Tomas clandestinas de extracción de petróleo de 1999-2006 (Pemex, 2007).

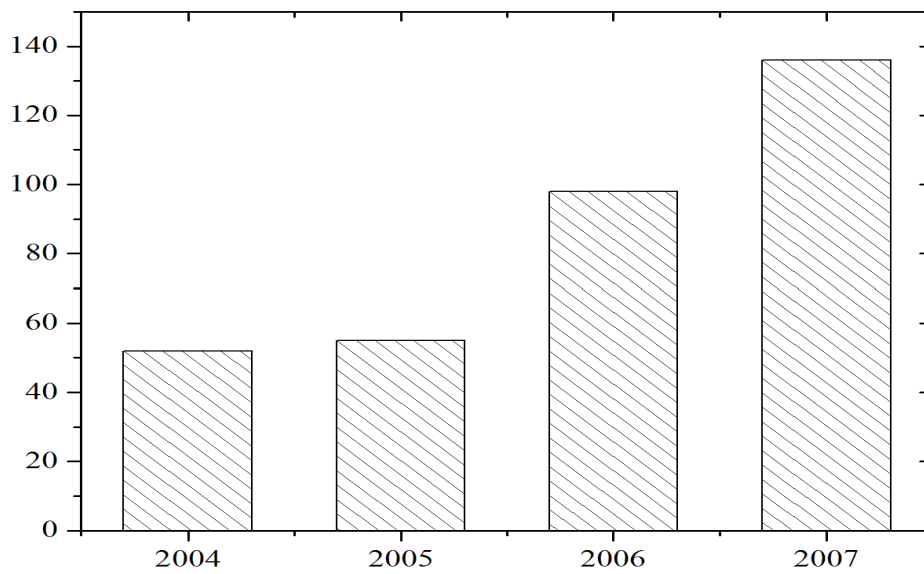


Figura 5. Tomas clandestinas de petróleo, reportadas por Pemex refinación durante el primer semestre de cada año (Pemex, 2007).

Las entidades con mayor incidencia de tomas clandestinas en el lapso de 2004 - 2007 fueron Veracruz con 87, cantidad que representa el 59% del total, seguida de 8 en Morelos, 8 en Chihuahua, 8 en el Estado de México, 7 en Sinaloa, 6 en Puebla, así como 4 en Oaxaca e igual número en Coahuila, entre otros (Ibídem, 2007).

Se estima que el volumen anual de residuos generados por Petróleos Mexicanos supera los 1.7 millones de toneladas, incluyendo desperdicios sólidos, semisólidos y líquidos. Aunque la legislación actual en la Norma Oficial Mexicana, NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 contempla la restauración de suelos, estableciendo acciones, límites máximos permisibles y criterios de muestreo, la contaminación por hidrocarburos en el país ya ha provocado diversas emergencias ambientales, con implicaciones sociales, económicas y ecológicas (Ortínez *et al.*, 2003). A modo de ejemplo, se puede mencionar que en el año 2001 la suma de fugas y derrames de hidrocarburos registrados fueron de 8,031 toneladas en crudo, diesel y gasolina, derramados en su mayoría en tierra, las que representaron el 0.6% de las emisiones y descargas totales de Pemex. El 75% de este volumen fue consecuencia de 73 eventos en instalaciones de Pemex refinación (PR) y el restante se debió a los 1,169 ocurridos en instalaciones de Pemex exploración y producción (PEP), como se puede apreciar en la Figura 6. Prácticamente todo el volumen derramado por Pemex refinación se registró en los cuatro sectores de ductos del país, con una incidencia de 48% en el Sector Sureste. En el caso de Pemex exploración y producción, el 97% del volumen se derramó en instalaciones en tierra (Pemex, 2001, 2007). En el informe anual de Pemex 1999, en términos de hidrocarburos líquidos transportados por ductos en tierra, PEP derramó 14.3 barriles por cada millón de barriles transportados, mientras que PR derramó 17.1.

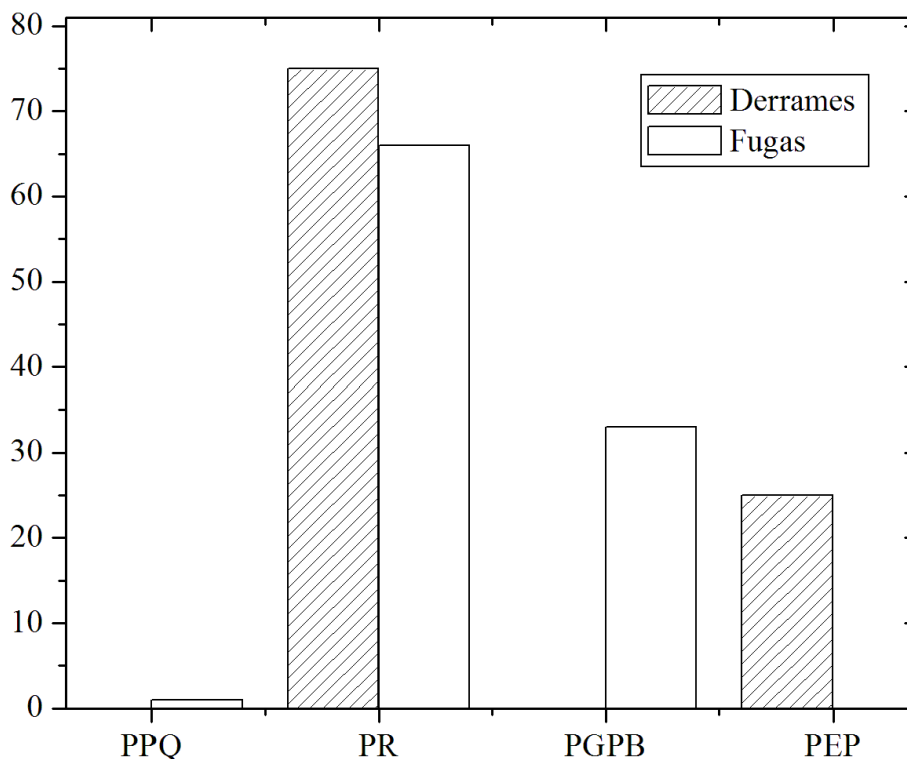


Figura 6. Número de casos de derrames y fugas con hidrocarburos en las cuatro divisiones del proceso del petróleo en Pemex durante 2001 (Pemex, 2007).

Los principales productos asociados a los derrames de hidrocarburos que generan contaminación en México son los siguientes: hidrocarburos de fracción pesada, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), hidrocarburos de fracción media, hidrocarburos de fracción ligera e hidrocarburos específicos [monoaromáticos (BTEX): benceno, tolueno, etilbenceno, y xilenos; y poliaromáticos: naftaleno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, acenafteno, fluoureno, pireno, criseno, benzopireno, benzo(a)antraceno] (Flores *et al.*, 2004). La Figura 7 muestra el porcentaje de sustancias derramadas accidentalmente, en donde destacan el petróleo crudo y sus derivados.

A nivel internacional existen varios criterios para definir los tipos y concentraciones de contaminantes derivados del petróleo en el suelo. En Europa, se considera como criterio la

concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, para el caso de México y Estados Unidos, el criterio que se ha adoptado es la concentración de HTP's (Hidrocarburos Totales del Petróleo) (Ferrera *et al.*, 2002). Los parámetros para considerar un suelo agrícola contaminado son: más de 1,000 mg HTPs /kg suelo, 0.08 mg/kg benzopireno ó 1 mg/kg de otros HAPs.

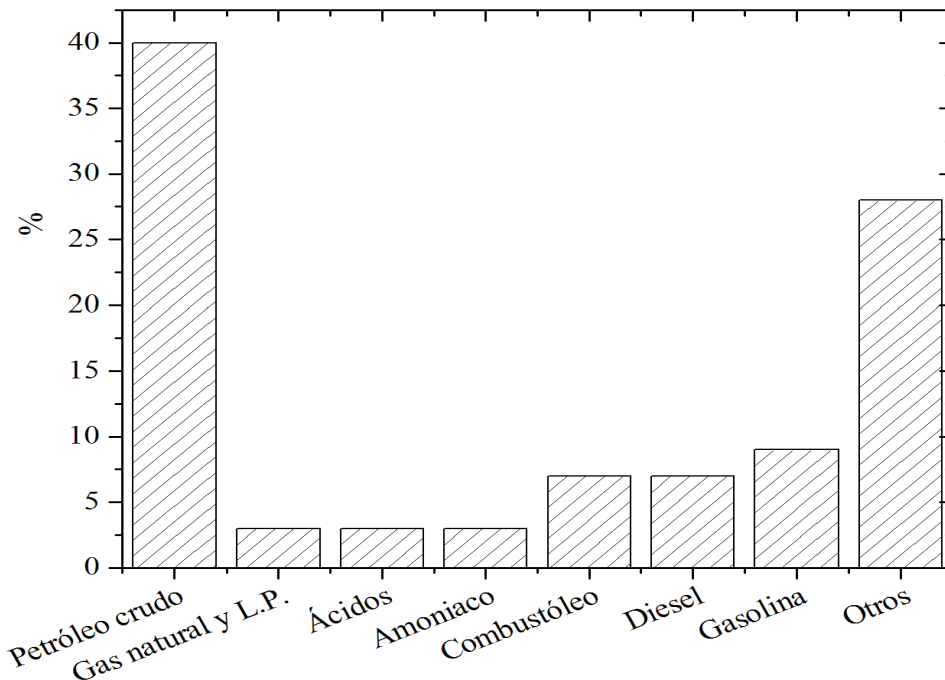


Figura 7. Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a la PROFEPA entre 1997 y 1999 (SEMARNAT, 2007).

La recuperación de zonas contaminadas por hidrocarburos en México incluye la evaluación del riesgo al ambiente y a la salud, involucrando acciones de remediación para la disminución de riesgos y exposición a los contaminantes, acciones de remediación con base en los niveles permisibles, así como acciones de monitoreo de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

En el caso reciente de la explosión y derrame de crudo en San Martín Texmelucan, Puebla, se afectaron más de 3 mil 183 m³ de suelo impregnado con hidrocarburo en la zona aledaña al punto de explosión, así como a las fuentes de riego agrícola que incluyen el río Atoyac, los canales de San Pedro Rojano, San Lucas y San Diego, correspondientes al Distrito de

Riego 056 (DR056) y 5 pozos que abastecen de agua potable. Pemex retiró los más de 3,000 m³ de suelo y limpió mediante el procedimiento de destrucción térmica, aprobado por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). Se instalaron de manera preventiva 30 barreras y cordones oleofílicos a lo largo del río Atoyac (desde el puente Rojo en San Martín Texmelucan hasta 2 km antes de la llegada a la presa Valsequillo), con la finalidad de retener grumos y natas de hidrocarburo quemado, así como absorber grasas.

2.2. El potencial de los hongos comestibles y los sustratos residuales derivados de la producción comercial en la biorremediación

Los hongos tienen un sistema enzimático que los hace capaces de degradar importantes componentes de la biomasa vegetal: la lignina, la celulosa y la hemicelulosa (Cullen, 1997; Leonowicz *et al.*, 1999). Este sistema enzimático que es producido particularmente por este tipo de hongos, puede ser empleado en la degradación de ciertos materiales tóxicos o contaminantes, gracias a que la lignina es un compuesto de naturaleza variable y compleja y a que las enzimas ligninolíticas tienen una baja especificidad por el sustrato, permitiéndoles actuar sobre sustancias que tienen una estructura química similar a la de la lignina, como lo son muchos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Madzak *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003). Los hongos comestibles, tienen así la capacidad de crecer e influir sobre diversos compuestos xenobióticos con estructura aromática.

Anteriormente, se pensaba que las lacasas solo oxidaban sustratos fenólicos por su bajo potencial redox, pero ahora se sabe que hay un gran número de mediadores que intervienen en una amplia variedad de sustratos, estos mediadores que son oxidados por las lacasas, en muchos casos resultan mucho más reactivos y pueden oxidar a su vez a un número mayor de compuestos (Desai y Nityanand, 2011). Recientemente, se ha considerado el gran potencial que tienen los hongos comestibles en los procesos degradadores de compuestos tóxicos en los suelos (Bumpus *et al.*, 1985; Eggen y Majcherczyk, 1998; Novotny *et al.*, 1999; Song, 1999; Pickard *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 1996; Bogan *et al.*, 1999; Canet *et al.*, 2001; Zheng y Obbard, 2002; Lau *et al.*, 2003; Leonardi *et al.*, 2007).

Los hongos comestibles, han mostrado ser de gran interés por su potencial biorremediador, particularmente en la degradación de los hidrocarburos poliaromáticos. Cerniglia (1997) reportó que el mecanismo de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos, se lleva a cabo a través de dos vías: 1) Sistema enzimático del citocromo P450 monooxigenasas y 2) Sistema enzimático ligninolítico. Dentro de este último, se puede mencionar a las laccasas entre las enzimas involucradas más importantes. La degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos comestibles ha sido ampliamente documentada (Pointing 2001) y estudiada *in vivo* e *in vitro* en diferentes sistemas incluyendo a *Rigidoporus lignosus* y su laccasa, en presencia de antraceno y metilantraceno (Cambria *et al.*, 2008), a *Pleurotus ostreatus* en presencia de naftaleno, antraceno, acenafteno, benzo-antraceno, pireno, fluoranteno, carbasol y bifenil, a *Cladosporium cladosporioides* con fenantreno, en medio líquido (Chávez *et al.*, 2005) y otros trabajos reportados en la literatura que han demostrado la capacidad de estos hongos en la degradación de los HAPs, así como la influencia de las enzimas ligninolíticas en este proceso (Majcherczyk *et al.*, 1998; Johannes y Majcherczyk, 2000; Hu *et al.*, 2009; Cambria *et al.*, 2008; Covino *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2009; Domínguez, *et al.*, 2007).

De igual manera se ha confirmado el potencial biorremediador de diversos hongos comestibles para otros compuestos xenobióticos, entre los que se pueden mencionar a *Pleurotus* spp. capaz de degradar PCB (bifenil policlorinados) (Kubátová *et al.*, 2001), atrazina, lindano (Rigas *et al.*, 2003), DDE (diclorodifenildicloroetileno) (Gong, 2006; Papadopoulou *et al.*, 2006); *Trametes versicolor* en la degradación de PCP (pentaclorofenol) (Walter *et al.*, 2004); *Bjerkandera adusta* para la degradación de HCH (hexaclorociclohexano) (Quintero *et al.*, 2007), *Coprinellus xanthothrix* capaz de crecer en suelos contaminados por polifenoles (Dritsa *et al.*, 2007); *Ganoderma australe* en la degradación de lindano (Rigas *et al.*, 2007) o *Agaricus* sp. en trabajos de remediación de suelos contaminados con metales pesados (García *et al.*, 2005); *Phanerochaete chrysosporium* uno de los hongos más estudiados en degradación de diversos compuestos: benzo(a)pireno, pireno, antraceno, criseno, pentaclorofenol, 4-cloroanilina, ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, bifenilos policlorinados, dioxinas, TNT(2,4,6-trinitrotolueno), DDT, lindano, clordano, toxafeno, cianidas, etc. (Pointing, 2001; Barr y Aust, 1994), entre otros.

2.3. La situación actual en México

Actualmente, la producción comercial de hongos comestibles cultivados es una actividad relevante en nuestro país, la cual genera beneficios sociales, económicos y ecológicos. Se estima que los volúmenes de producción ascienden a más o menos 47,468 toneladas anuales de hongos frescos. La inversión nacional para la producción comercial de hongos comestibles y sus productos funcionales en México se estimó para la última década en cerca de 150 millones de dólares americanos. Con esto se obtuvo de 1991 a 2009 un incremento del 414.9% en la producción nacional (Martínez-Carrera y López Martínez, 2010). Hoy en día, nuestro país es el mayor productor de hongos comestibles de Latinoamérica, ya que genera alrededor del 58.9% de la producción total y lo ubica como el décimo sexto productor a nivel mundial. El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares, generando alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). Los hongos que se cultivan comercialmente a pequeña y gran escala en México son: los champiñones (*Agaricus*), las “setas” (*Pleurotus*, existen varias especies cultivables, entre las que se encuentran: *P. pulmonarius*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. djamor*), el shiitake (*Lentinula*), el reishi (*Ganoderma*) y el maitake (*Grifola*). Comparativamente, en el año 2004, el volumen de producción de hongos comestibles en el país fue superior al del cacao (43,974 ton/año), equivalente al del ajo (47,917 ton/año), y un poco inferior al del chícharo (53,717 ton/año), del tomate cherry (54,592 ton/año), y de las hortalizas (62,487 ton/año) (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

La biorremediación en la recuperación de suelos contaminados por petróleo ha resultado una técnica difundida y exitosa en México a partir de los primeros trabajos que se han llevado a cabo en el sureste del país en zonas tropicales afectadas por hidrocarburos del petróleo (Adams-Schroeders *et al.*, 1999). Actualmente, los hongos comestibles ofrecen una nueva alternativa para mejorar los métodos de descontaminación de suelos. Las empresas mexicanas dedicadas a la remediación comercial de suelos cuentan con permisos otorgados por la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT) y están enfocadas a remediar sitios contaminados por compuestos orgánicos. Dentro de los contaminantes tratados con mayor frecuencia, se encuentran los HTP y los HAPs, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación (SEMARNAT, 2007). De acuerdo con datos proporcionados por cuarenta de estas empresas, la biorremediación es una de las tecnologías más comúnmente empleadas (48%),

siendo las más utilizadas, el compostaje y la biolabranza. El lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México (Figura 8).

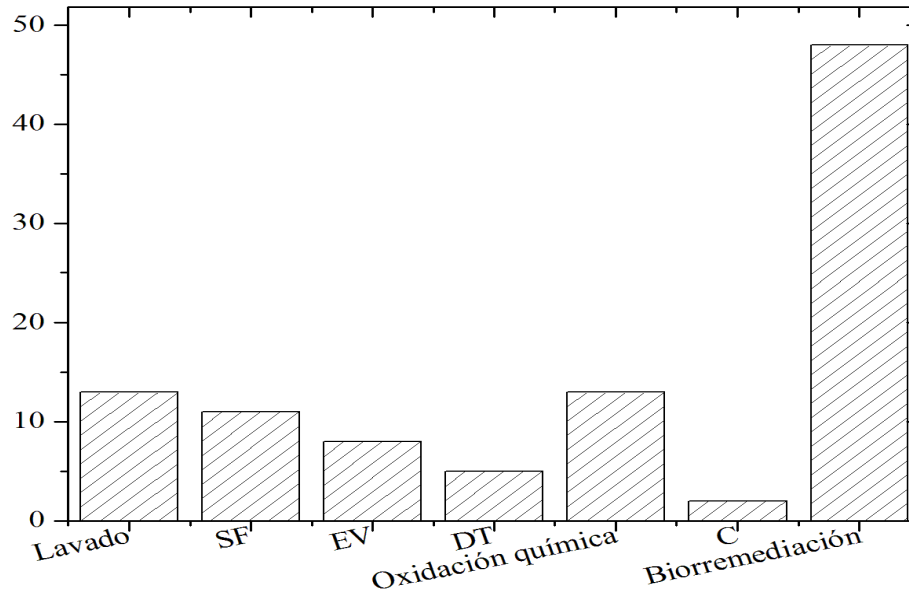


Figura 8. Tecnologías de remediación para suelos utilizadas en México por empresas autorizadas. SF: Separación física. EV: Extracción de vapores. DT: Desorción térmica. C: Centrifugación (SEMARNAT, 2007).

La mayor parte de los estudios sobre microorganismos biorremediadores de hidrocarburos en México, se han realizado solo a nivel de laboratorio, empleando bacterias, mohos y hongos basidiomicetos crecidos en diversos medios de cultivo y sustratos lignocelulósicos, al igual que plantas en procesos de fitorremediación (Olguín *et al.*, 2007). Dentro de las instituciones nacionales que estudian la capacidad de los hongos comestibles para degradar hidrocarburos, así como otras formas de biorremediación de suelos se pueden mencionar los siguientes: En el Colegio de Postgraduados se han desarrollado varios trabajos sobre la capacidad que tienen cepas de *Pleurotus* y otros microorganismos para adaptarse y crecer en suelos y medios de cultivo en presencia de petróleo. Diversas investigaciones reportaron la capacidad de varios hongos y bacterias que han sido sometidos por largos períodos de tiempo, a suelos contaminados hasta por 322,840 mg/kg, también reportaron la capacidad de cepas del género *Pleurotus* para fructificar en ambientes con concentraciones de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) de

hasta 25,000 mg/L (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Ferrera *et al.*, 2002; Ferrera *et al.*, 2007). En otro de los trabajos presentados en el área de biorremediación por este grupo, se midió la capacidad de degradación con pasto alemán asociado a bacterias y a hongos de rizósfera en un proceso de fitorremediación (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; 2004).

En el CINVESTAV y la UAEM se llevaron a cabo procesos de bioestimulación y bioaumentación, por ejemplo, la adición de hongos filamentosos (Mancera-López *et al.*, 2008) el uso de compost de bagazo de caña de azúcar para la eliminación de hidrocarburos (Chávez-Gómez *et al.*, 2003; Pérez-Armendáriz *et al.*, 2004); o la utilización de mecanismos *ex situ* como el tambor rotatorio aplicados a procesos de biorremediación de suelos (Manilla-Perez *et al.*, 2004). Los hongos y mohos reportados que han mostrado buen desarrollo en medios de cultivo con petróleo o que han removido hidrocarburos de suelos contaminados fueron principalmente: *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces*, *Penicillium glabrum* y *Trichoderma* (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2004). Las experiencias de biorremediación en campo se han desarrollado en suelos arcillosos contaminados por hidrocarburos y BTEX, empleando cultivos nativos de bacterias degradadoras de diesel y gasolina. Por su parte, el hongo basidiomiceto más estudiado para la degradación de HAPs y PCBs ha sido *Phanerochaete chrysosporium* (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1999; Fernández-Sánchez *et al.*, 2001).

Son varios los investigadores mexicanos que creen que el compost es una de las mejores alternativas tecnológicas, para la biorremediación de suelos contaminados en nuestro país (Velasco y Volke, 2003; Sauri-Riancho y Castillo-Borges, 2002).

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Existe un esfuerzo mundial en la implementación de nuevas técnicas que ayuden a solucionar problemas ambientales, considerándose entre los métodos con mayor aceptación por su eficiencia y bajos riesgos ecológicos los relacionados con la biorremediación, siendo los hongos comestibles, los organismos con un gran potencial biotecnológico, especialmente por su capacidad particular de producir y liberar al medio enzimas altamente degradadoras de compuestos tóxicos.

Los hongos comestibles han sido estudiados por sus propiedades alimenticias y enzimáticas, sin embargo, aún quedan muchas propiedades por conocer. Son pocos los grupos de científicos que se han dedicado a generar conocimiento a través de estos seres vivos tan fascinantes. No se tienen aún estudios consistentes sobre el potencial de los hongos comestibles en procesos de biorremediación *in situ* y todavía falta aclarar muchas dudas sobre las capacidades metabólicas de los hongos comestibles y su comportamiento en situaciones determinadas, como lo son los procesos de biorremediación. Así mismo, desarrollar métodos de evaluación apropiados para construir las bases científicas y técnicas que lleven al diseño de estrategias de desarrollo, de diversificación de usos y que permitan favorecer un mejor aprovechamiento de los recursos biológicos nacionales.

Es necesario además, incluir a los hongos comestibles en una visión de desarrollo tecnológico, en donde por medio de mejoras innovadoras se obtengan herramientas biotecnológicas útiles en la resolución de problemas específicos de vital importancia, con métodos mejorados y sustentables, ya que en México la adopción de prácticas biológicas y biotecnológicas para remediar suelos contaminados es todavía muy limitada, a pesar del gran número de accidentes y eventos relacionados con derrames de petróleos en nuestros suelos. Actualmente existen las condiciones en México que justifican plenamente la realización de investigación para fortalecer la utilización de las enzimas producidas por hongos comestibles en los procesos de biorremediación *in situ*. Esto en virtud de la amplia disponibilidad y subutilización de los sustratos parcialmente degradados por los hongos comestibles, derivados de la producción comercial y que se estiman en cerca de 500,000 ton/año (Martinez-Carrera y

López-Martínez, 2010), así como de un registro creciente de zonas contaminadas por hidrocarburos en el país.

IV. HIPÓTESIS GENERAL

Los hongos comestibles presentan variabilidad en su capacidad de producir actividad de lacasas de acuerdo al género, especie o cepa. Los hongos productores de lacasas tienen la habilidad de crecer y desarrollarse en presencia de un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), el antraceno, y pueden ser utilizados en la formulación de una estrategia biológica para biorremediar zonas agrícolas contaminadas por derrames de petróleo.

V. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar cepas de hongos comestibles productoras de enzimas lacasas, capaces de crecer en presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, las cuales puedan ser potencialmente utilizadas como parte de una estrategia biotecnológica para biorremediar zonas agrícolas contaminadas por hidrocarburos en México.

PARTE II: DESARROLLO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS PRODUCIDAS POR HONGOS COMESTIBLES

1.1. RESUMEN

Quince cepas de hongos comestibles de la colección del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC), pertenecientes a los géneros de *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lentinula* y *Coprinopsis*, fueron estudiadas para seleccionar a la mejor cepa productora de actividad de lacasas. La selección se realizó en dos etapas, la primera consistió en una preselección cualitativa, con la cual se identificaron a los 9 hongos con mayor potencial para oxidar diferentes sustratos enzimáticos, ácido 2, 2' Azinobis-3-etil- benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS), 2,6-dimetoxifenol (DMP) y guayacol en medio de cultivo extracto de malta con agar (EMA). La segunda etapa radicó en una evaluación cuantitativa, por métodos espectrofotométricos, los hongos se desarrollaron en medio de cultivo líquido con extracto de malta (EMB) suplementado con 0.1 mM de sulfato de cobre y los resultados mostraron que dos cepas del género *Pleurotus* CP-50 (4,000 U/ml) y CP-267 (2,500 U/ml) fueron las mejores productoras de actividad de lacasas, considerablemente superiores a cepas de otros géneros, *Ganoderma lucidum*, la cual registró solo 1 U/ml de actividad, o *Lentinula edodes* con 20 U/ml. Por lo cual, la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* fue seleccionada para realizar los ensayos de biorremediación *in vitro*.

1.2. OBJETIVOS

1. Preseleccionar cepas de hongos comestibles evaluando cualitativamente la producción de lacasas.
2. Analizar cuantitativamente la capacidad de producir actividad de lacasas de las cepas preseleccionadas utilizando diferentes sustratos enzimáticos.

3. Seleccionar la mejor cepa productora de actividad de lacasas.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Material biológico

Las cepas de hongos estudiadas se encuentran depositadas en el CREGENHC (Sobal *et al.*, 2007), pertenecen a los géneros *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lentinula* y *Coprinopsis*. La especie particular de cada uno, así como el número de registro y su procedencia se muestran en el Cuadro 4.

Los hongos se sembraron y mantuvieron en medio de cultivo de agar con extracto de malta (EMA 30 g/L, Bioxon), el cual se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se disolvió calentándolo en microondas y posteriormente se esterilizó durante 20 minutos en autoclave (15 libras de presión, 121°C).

Cuadro 4. Cepas de hongos comestibles utilizadas en el presente estudio.

Clave	Especie	Procedencia
CP-5	<i>Lentinula boryana</i> (Berk. & Mont.) Pegler	Veracruz
CP-7	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Hong Kong
CP-18	<i>Pleurotus cystidiosus</i> O.K. Mill	Veracruz
CP-30	<i>Pleurotus levis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Singer	Puebla
CP-50	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	Comercial
CP-98	<i>Pleurotus</i> sp.	Hidalgo
CP-194	<i>Pleurotus</i> sp.	Tlaxcala
CP-205	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst	Puebla
CP-250	<i>Coprinopsis</i> spp.	Puebla
CP-253	<i>Pleurotus djamor</i> (Rumph. ex Fr.) Boedijn	Tabasco
CP-267	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél	Nuevo León
CP-328	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél	Durango
CP-389	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst	Morelos
CP-476	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst	Jalisco
CP-492	<i>Lentinula boryana</i> (Berk. & Mont.) Pegler	Veracruz

Fuente: CREGENHC, Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla.

1.3.2. Evaluación de la producción de la actividad de lacasas

Evaluación cualitativa. La preselección de las cepas productoras de actividad de lacasas se llevó a cabo de manera similar a Kilaru *et al.*, 2006b, utilizando medio de cultivo de agar con extracto de malta para las cepas: CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, CP-30 de *Pleurotus levis*, CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, CP-98 de *Pleurotus* sp., CP-194 de *Pleurotus* sp., CP-205 de *Ganoderma lucidum*, CP-253 de *Pleurotus djamor*, CP-267 de *Pleurotus pulmonarius*, CP-328 de *Pleurotus ostreatus*, CP-389 de *Ganoderma lucidum* y CP-476 de *Ganoderma lucidum*; medio de cultivo de agar papa dextrosa para las cepas: CP-5 de *Lentinula boryana*, CP-7 de *Lentinula edodes* y CP-492 de *Lentinula boryana*; y medio de cultivo agar papa dextrosa alcalinizado a pH 11 con hidróxido de potasio (KOH, Bioxon) 1 M, para la cepa CP-250 de *Coprinopsis* spp. Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las indicaciones del fabricante y fueron adicionados con sustratos enzimáticos incoloros que al ser oxidados con la presencia de las enzimas lacasas colorearon el medio. Los sustratos enzimáticos utilizados en este ensayo fueron: ácido 2, 2' Azinobis-3-etil- benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS, Sigma) 0.5 mM, 2,6-dimetoxifenol (DMP, Sigma) 0.2 mM y guayacol (Sigma) 0.5 mM. Las soluciones de stock de los sustratos enzimáticos se prepararon diluyendo el compuesto en agua para ABTS y guayacol y en etanol para DMP. Cada solución fue esterilizada con filtro DISMIC-25_{AS} (Advantec), con tamaño de poro de 0.20 µm y adicionada al medio antes de verterlo a las cajas de Petri de 9 mm de diámetro.

Después de gelificado el medio, se inoculó un fragmento de 5 mm de diámetro de micelio precrecido en medio de cultivo EMA, al centro de cada caja de Petri que contenía 25 ml de medio de cultivo EMA, adicionado con uno de los sustratos enzimáticos mencionados.

Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a temperatura ambiente (20°-26°C) durante 15 días. Se midió periódicamente (cada tercer día) el diámetro de las colonias y el halo de color producido por cada cepa.

Los medios suplementados con ABTS, mostraron una coloración morada, los suplementados con DMP, una coloración amarilla, y los suplementados con guayacol, una coloración rosa. El tamaño del halo y la intensidad del color fueron indicativos de la actividad de

las lacasas presentes en el medio. Así, los medios que presentaron mayor tamaño de halo y/o mayor intensidad de color correspondieron a los medios que contenían a los hongos productores de mayor actividad de lacasas.

Determinación del pH de los medios de cultivo. Se midió el pH de los medios de cultivo adicionados con los sustratos enzimáticos, utilizados en el crecimiento de los hongos comestibles, considerando los siguientes tratamientos y controles: 1) Medio sin sustrato enzimático y sin inóculo; 2) Medio con adición de sustrato enzimático; 3) Medio después de 15 días de crecimiento micelial de la cepa.

Los medios de cultivo se vertieron a tubos falcon, sin adicionar agua, se homogeneizó el contenido de cada uno con la ayuda de una mezcladora comercial (Hamilton Beach), a máxima velocidad, durante 1 minuto. Se introdujo el electrodo de semisólidos del potenciómetro (Conductronic PH120) directamente en la muestra homogeneizada, se tomó la lectura de pH y de temperatura (Figura 9).

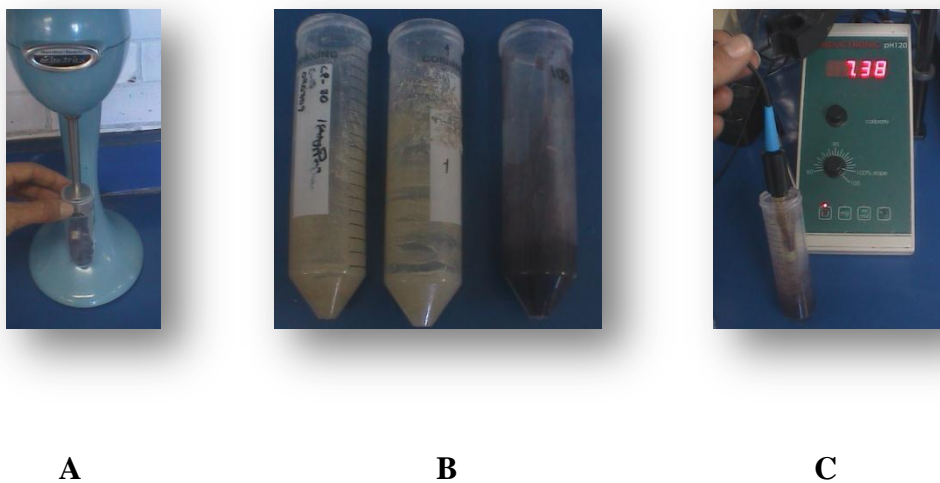


Figura 9. Medición de pH en medios de cultivos con colonias miceliales adicionados con diferentes sustratos. A: Homogenización con mezcladora comercial. B: Medios de cultivo homogenizados en tubos falcon. C: Medición de pH de medios de cultivo homogeneizados, utilizando electrodo de semisólidos.

Evaluación cuantitativa. Se preparó un precultivo agregando 25 ml de medio de cultivo líquido con extracto de malta (30 g/L, Bioxon) y extracto de levadura (4 g/L Bioxon), en cada frasco de vidrio de 200 ml. Separadamente se preparó una solución stock de sulfato de cobre (CuSO_4 , J. T. Backer) disolviéndolo en agua y esterilizándolo con filtro DISMIC-25_{AS} (Advantec), con tamaño de poro de 0.20 μm . La solución de sulfato de cobre se adicionó a los medios para obtener una concentración de 0.1 mM. Posteriormente cada frasco fue inoculado con 10 fragmentos de 5 mm de diámetro de micelio previamente crecidos en placas de Petri, con 25 ml de medio EMA. Los frascos inoculados se incubaron durante 2-6 semanas dependiendo de cada cepa, a temperatura ambiente (20°-26°C) de manera estacionaria, hasta su colonización.

Homogenización de los precultivos. Cuando se obtuvo la suficiente cantidad de crecimiento micelial en los precultivos, aproximadamente 50% en relación al volumen del medio de cultivo (Figura 10), se llevó a cabo la homogeneización en condiciones estériles con la ayuda de un homogeneizador (PRO SC250), con rotor de 2 cm de diámetro, a 10,000 rpm durante 2 minutos, introduciendo el molino directamente al interior de los frascos de vidrio.



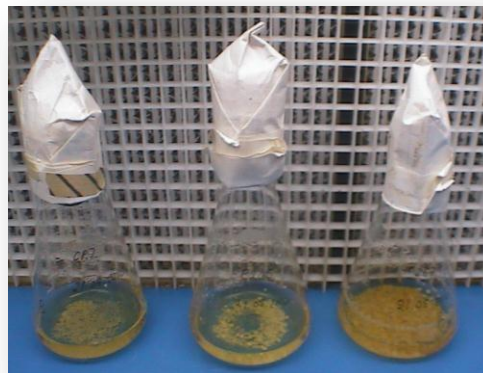
Figura 10. Colonización del hongo en el medio de cultivo estacionario o precultivo.

Inoculación de medios agitados. La solución homogeneizada de los precultivos se inoculó al 5% en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 95 ml de medio líquido con extracto de malta (EMB, total: 100 ml). Los matraces se colocaron en una incubadora (Barndstead/Lab Line) con agitación constante, a 150 rpm y temperatura de 20°-26°C, durante 8 días o más,

dependiendo del comportamiento de la actividad de lacasas y de la cepa. El ensayo se realizó por duplicado (Figura 11).



A



B

Figura 11. Cepas de hongos comestibles creciendo en medio líquido EMB para la evaluación de actividad de lacasas. A: Incubadora con matraces inoculados con hongos. B: Pellets de hongos creciendo en medio EMB.

Medición de la actividad de lacasas. A partir del primer día de crecimiento, se tomaron diariamente, dos alícuotas de 500 μ l para cada uno de los matraces, en condiciones de esterilidad. Las muestras se depositaron en tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugaron (Eppendorf 5415 C) a 13,200 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recolectó en otro tubo Eppendorf. La actividad enzimática de las lacasas se midió, según el método de Bourbonnais y Paice (1990), utilizando microplacas de fondo en forma de U (Biotek). El sistema de medición se realizó en espectrofotómetro (BIOTEK), con 160 μ l de buffer de acetato de sodio (J. T. Baker) 1 M, pH 5, preparado fresco y ajustado con ácido acético glacial (J. T. Baker) 1M, pH 5; 20 μ l de muestra, (el tubo Eppendorf con el sobrenadante se agitó en vórtex (Heidolph 541-1000C-01-0) antes de tomar la muestra y colocarla en la microplaca) y 20 μ l de sustrato enzimático ABTS 0.5 mM (Longitud de onda de lectura: 420 nm, coeficiente de extinción: 36,000 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución de sustrato enzimático de ABTS se realizó diluyendo el comupesto en agua y se adicionó

inmediatamente antes de la lectura. Las pruebas se realizaron por triplicado. El programa de análisis utilizado fue el GEN 5 (BIOTEK).

La oxidación de los sustratos enzimáticos fue monitoreada con el incremento de la absorbancia durante 6 minutos. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que se requiere para oxidar 1 μM de sustrato por minuto. La actividad de lacasas se expresó en U/ml. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadísticos. El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones.

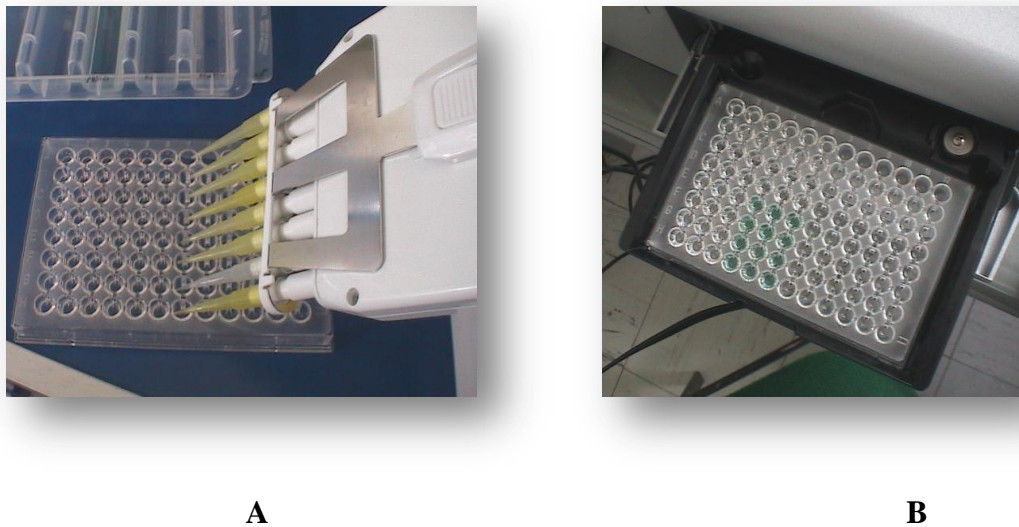


Figura 12. Medición de la actividad de lacasas, A: Llenado de microplaca con solución buffer. B: Lectura de la oxidación de ABTS en espectrofotómetro.

1.4. RESULTADOS

1.4.1. Evaluación de la producción de la actividad de lacasas

Evaluación cualitativa. La visualización de la actividad enzimática que se obtuvo con la generación de halos de color morado, amarillo o rosa, producidos por las enzimas extracelulares que oxidaron a cada uno de los sustratos enzimáticos adicionados al medio (ABTS, DMP o guayacol respectivamente). Las cepas evaluadas mostraron diferencias cualitativas en su capacidad para colorear el medio de cultivo, debido a la oxidación de los sustratos enzimáticos. Las cepas del género *Pleurotus*, fueron en general, las que mostraron coloraciones más intensas y halos de mayor tamaño.

Los distintos sustratos empleados (ABTS, DMP y guayacol) demostraron reaccionar de diferente manera con una misma cepa. De la misma forma, se observaron diferentes efectos con un mismo sustrato entre las diversas cepas estudiadas (Figuras 13-62). El sustrato DMP fue muy reactivo, formando halos mayores en tamaño al diámetro micelial (Figuras 20, 23, 26, 35, 38, 41, 44, 50 y 56). El sustrato ABTS presentó rápidamente coloración en el medio, sin embargo, con el tiempo, el crecimiento micelial llegó a alcanzar en muchas ocasiones el tamaño del halo de color (Figuras 13, 16, 25, 28, 31, 34, 40, 43, 46, 49 y 52). El sustrato guayacol mostró muy poca reactividad a la presencia de lacasas en las condiciones de cultivo establecidas, en la mayoría de las pruebas se originó poca coloración en el medio, únicamente en la zona bajo el crecimiento micelial (Figuras 15, 18, 21, 27, 36, 39, 45, 51, 54 y 57).

Las cepas que presentaron halos de color mayores al diámetro micelial, con los dos sustratos enzimáticos más reactivos (ABTS y DMP) fueron: CP-5 de *Lentinula boryana* (Figuras 13 y 14); CP-30 de *Pleurotus levis* (Figuras 22 y 23); CP-50 de *Pleurotus ostreatus* (Figuras 25 y 26); CP-253 de *Pleurotus djamor* (Figuras 40 y 41); CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* (Figuras 43 y 44) y CP-492 de *Lentinula boryana* (Figuras 55 y 56).

Los hongos comestibles que produjeron poca coloración al medio (conservado al reverso de la placa) y que por lo tanto, revelaron una pobre oxidación enzimática fueron: CP-7 de *Lentinula edodes* (Figuras 16 y 17); CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* (Figuras 19 y 20); CP-98 de *Pleurotus* sp. (Figuras 28 y 29); CP-194 de *Pleurotus* sp. (Figuras 31 y 32); CP-205 de

Ganoderma sp. (Figuras 34 y 35); CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* (Figuras 46 y 47); CP-389 de *Ganoderma lucidum* (Figuras 49 y 50) y CP-476 de *Ganoderma lucidum* (Figuras 52 y 53).

Las cepas del género *Ganoderma* mostraron un crecimiento micelial abundante al sexto día de cultivo, sin embargo, solo mostraron poca coloración del medio, lo cual indicó una baja actividad de lacasas. Las cepas que mostraron la menor coloración del medio fueron las cepas CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* (Figuras 19-21) y CP-98 de *Pleurotus* sp. (Figuras 28-30).

Para el siguiente experimento, se seleccionaron las cepas con mejor desempeño en la coloración de los medios de cultivo, que fueron: CP-50, CP-267, CP-30, CP-194 y CP-253, pertenecientes todas al género *Pleurotus*. Se seleccionó además, una cepa del género *Lentinula* (CP-7) y otra del género *Ganoderma* (CP-205). También se incluyeron dos cepas de *Pleurotus* que no produjeron coloración importante en el medio (CP-328 y CP-98).

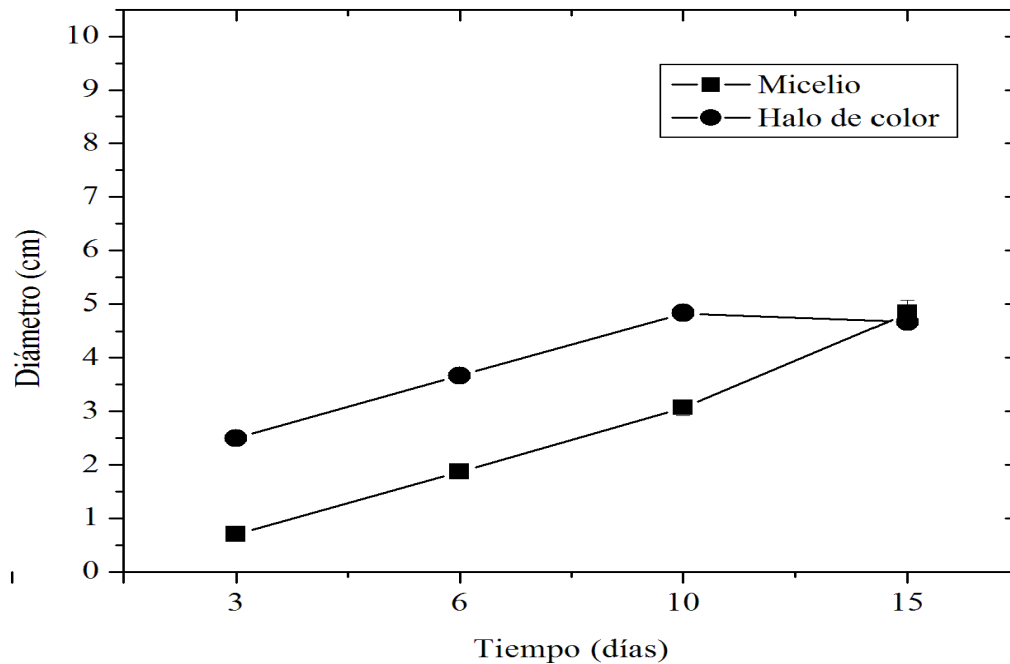


Figura 13. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-5 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

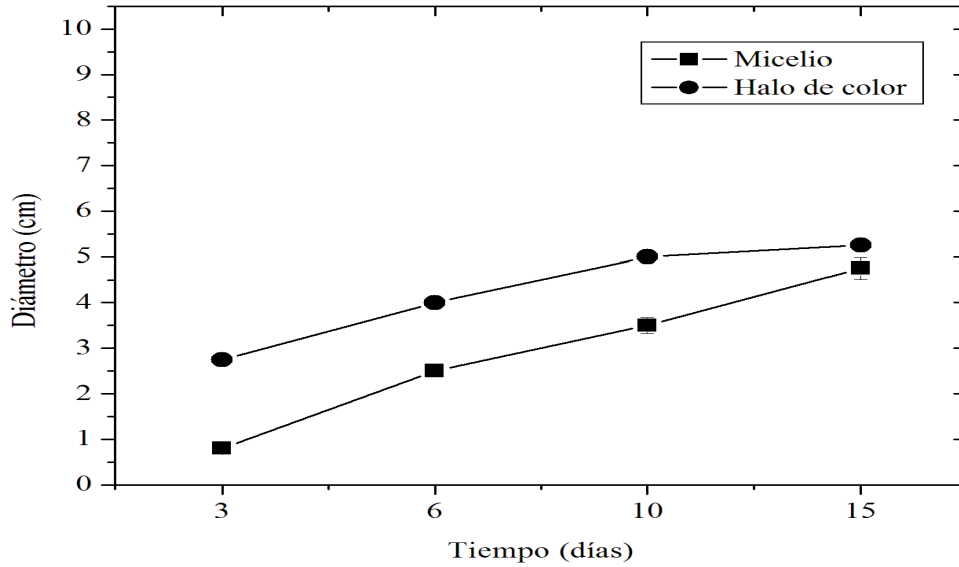


Figura 14. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-5 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

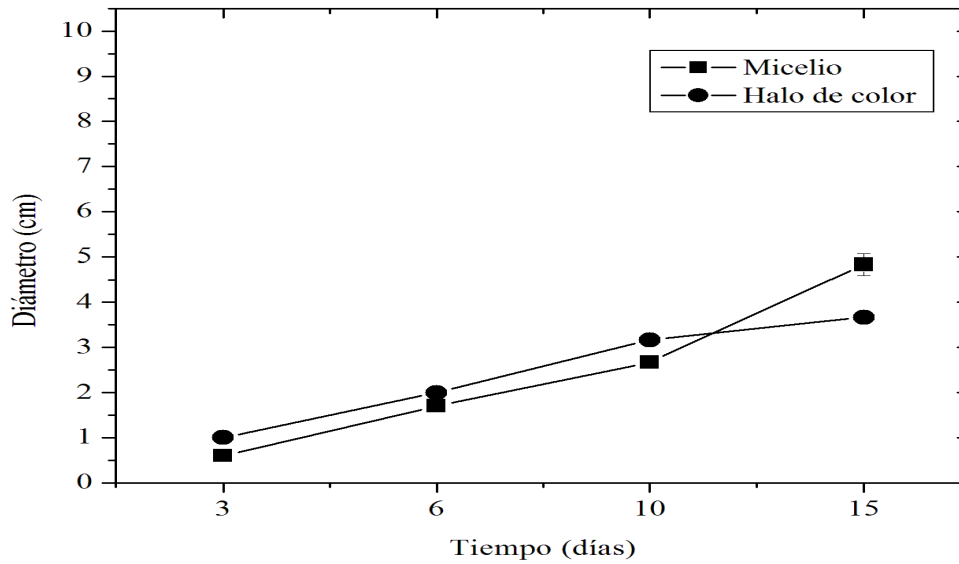


Figura 15. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-5 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

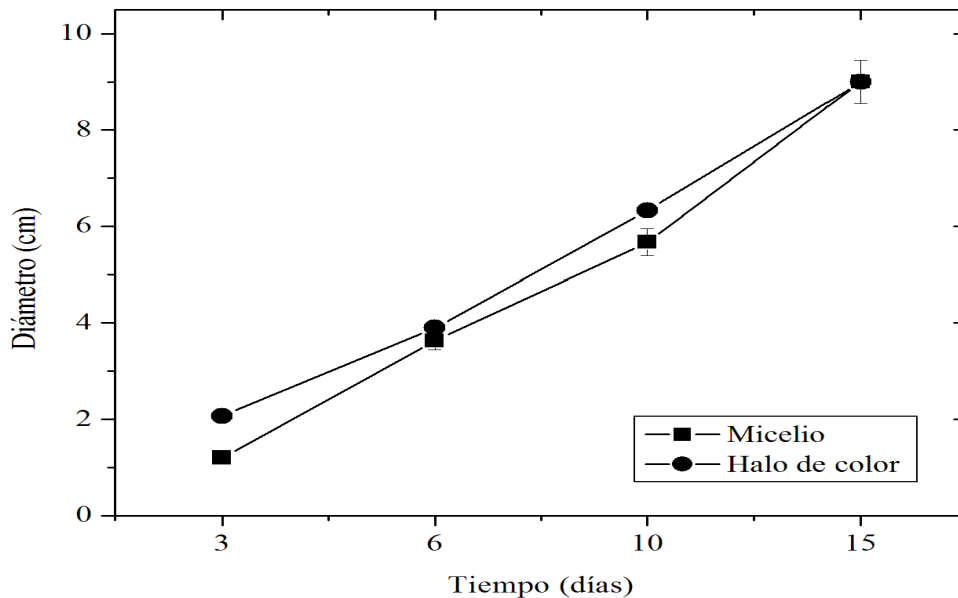


Figura 16. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

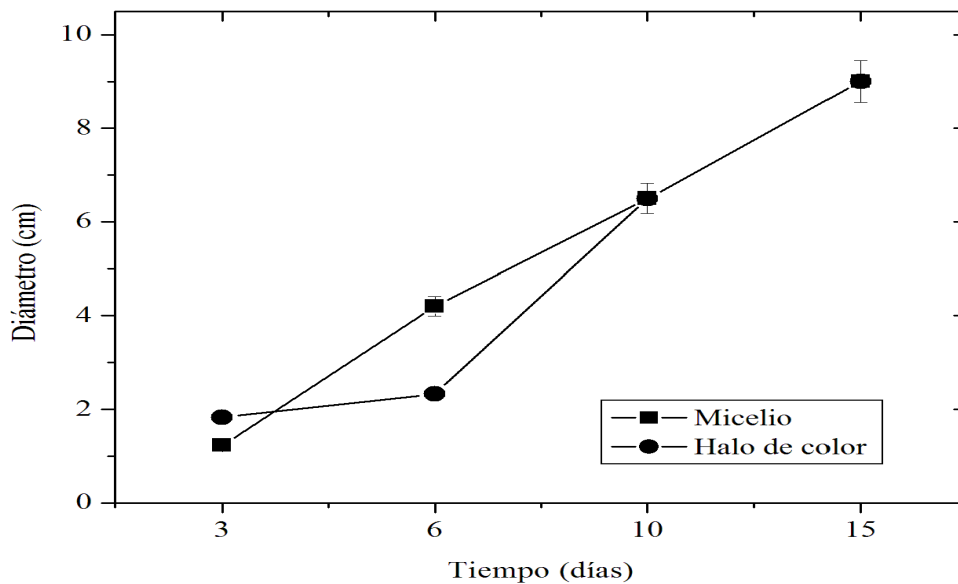


Figura 17. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

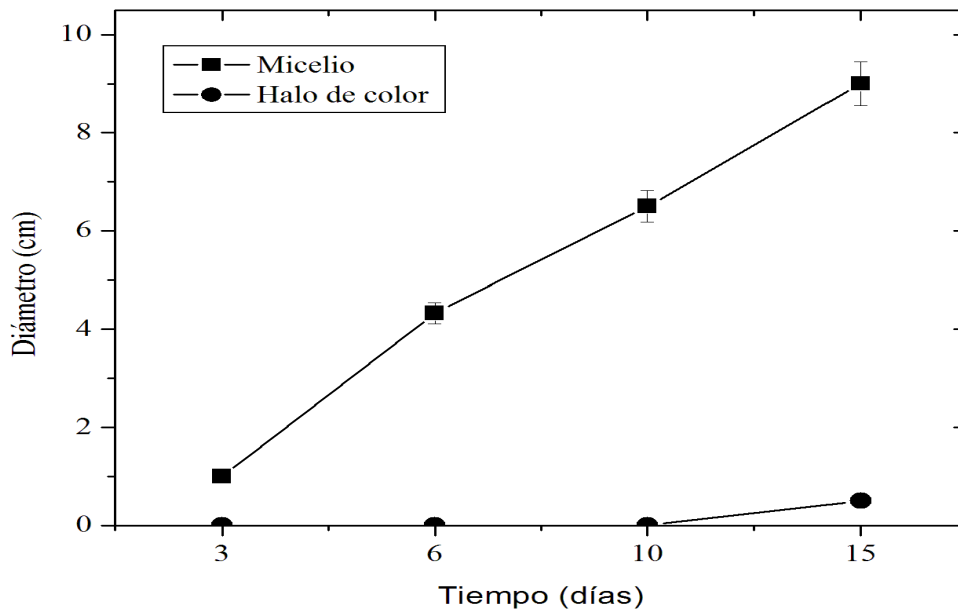


Figura 18. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

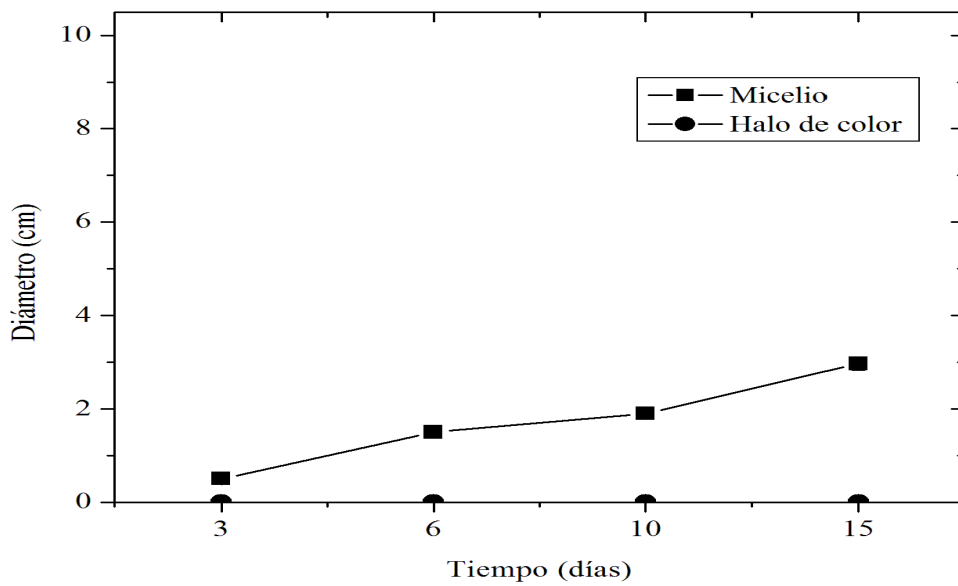


Figura 19. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

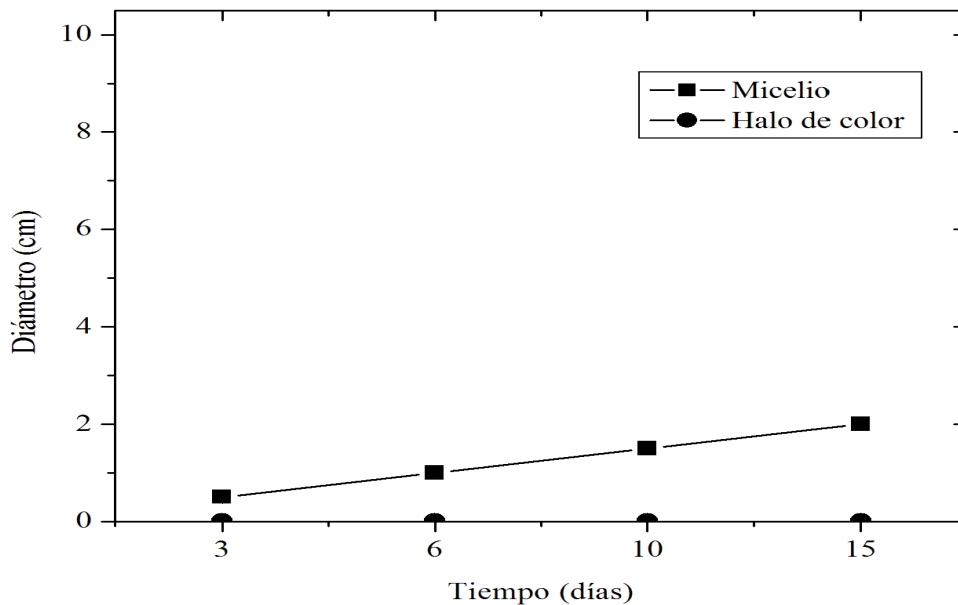


Figura 20. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

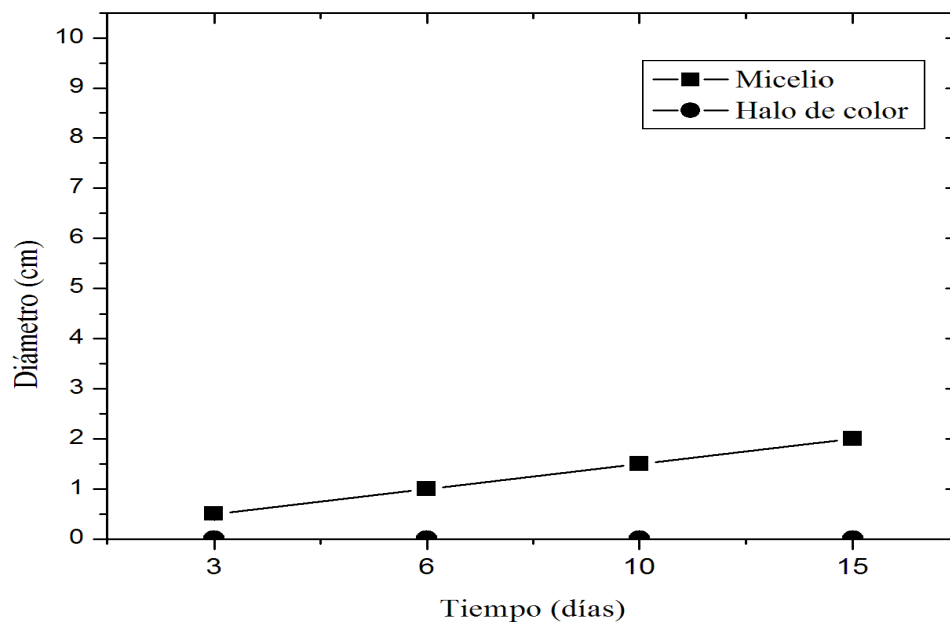


Figura 21. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

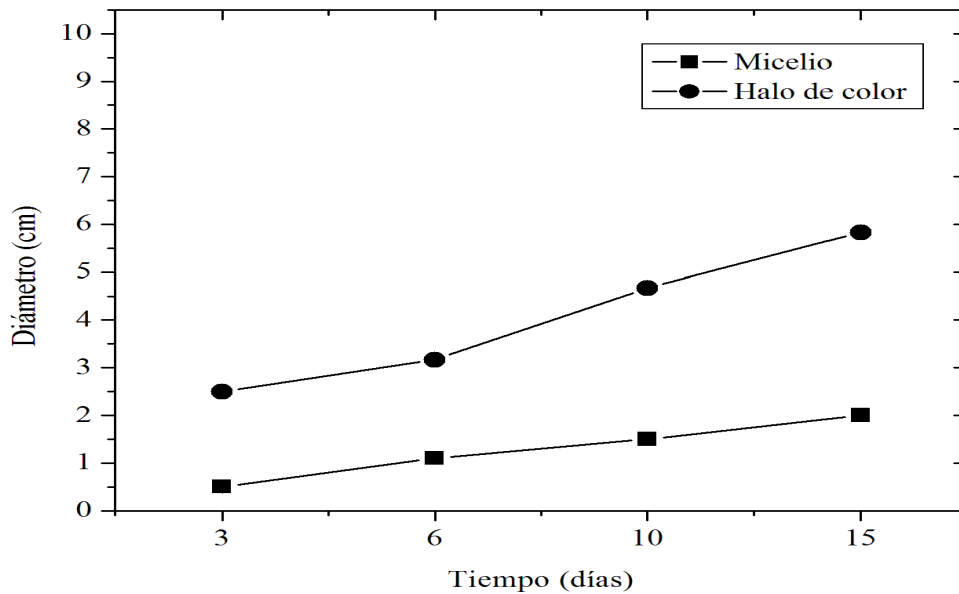


Figura 22. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

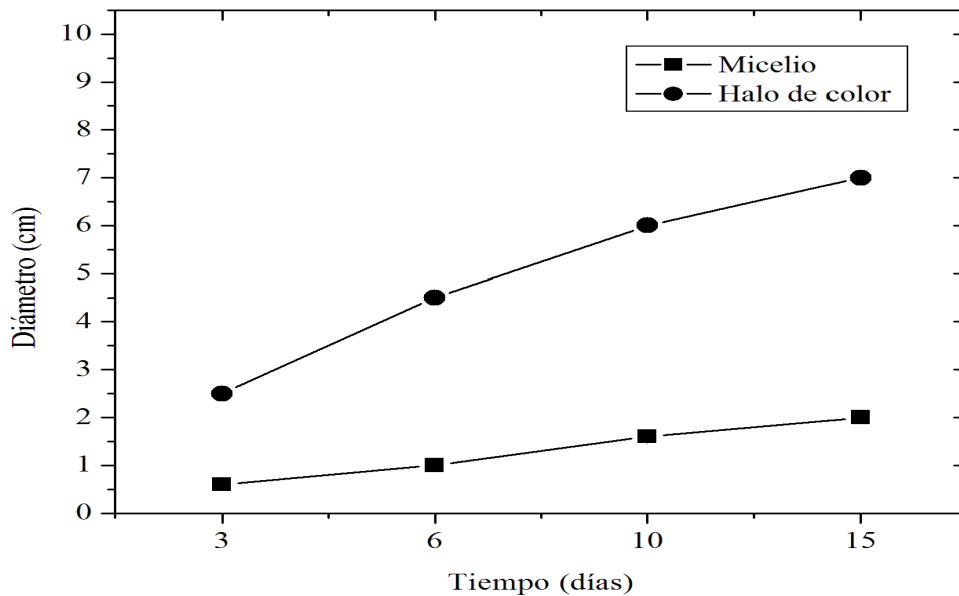


Figura 23. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

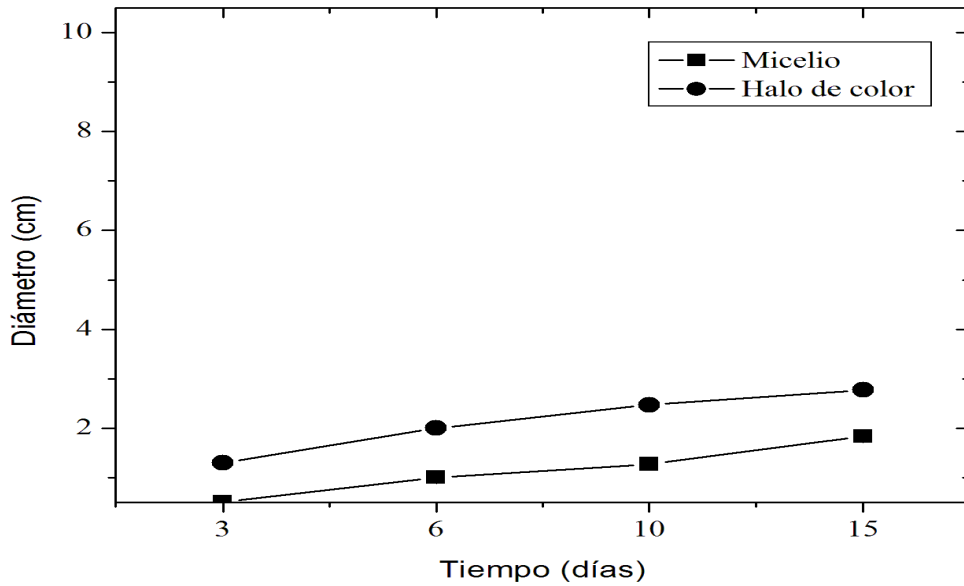


Figura 24. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

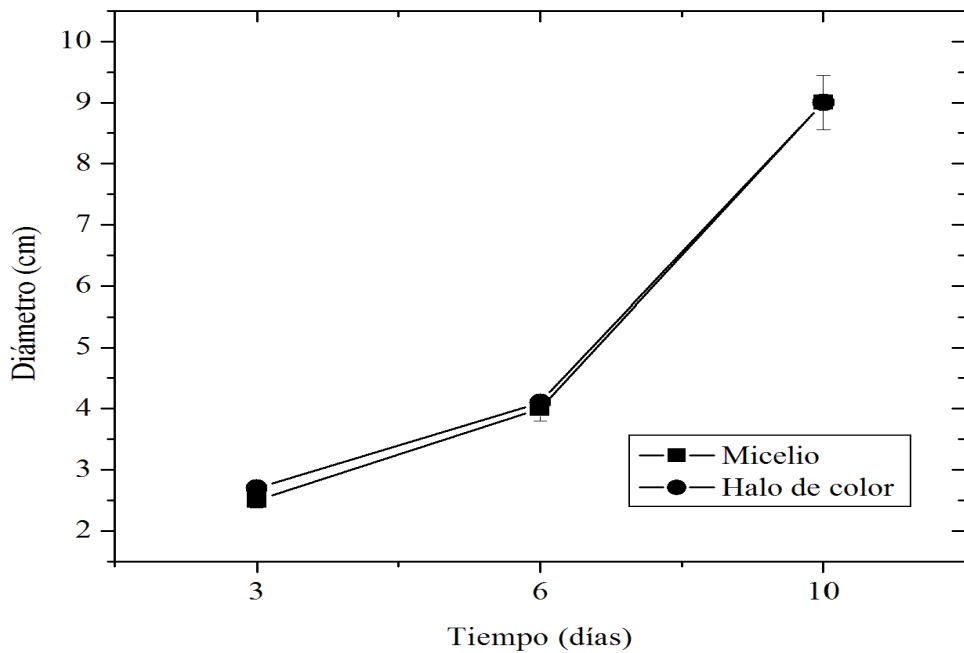


Figura 25. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

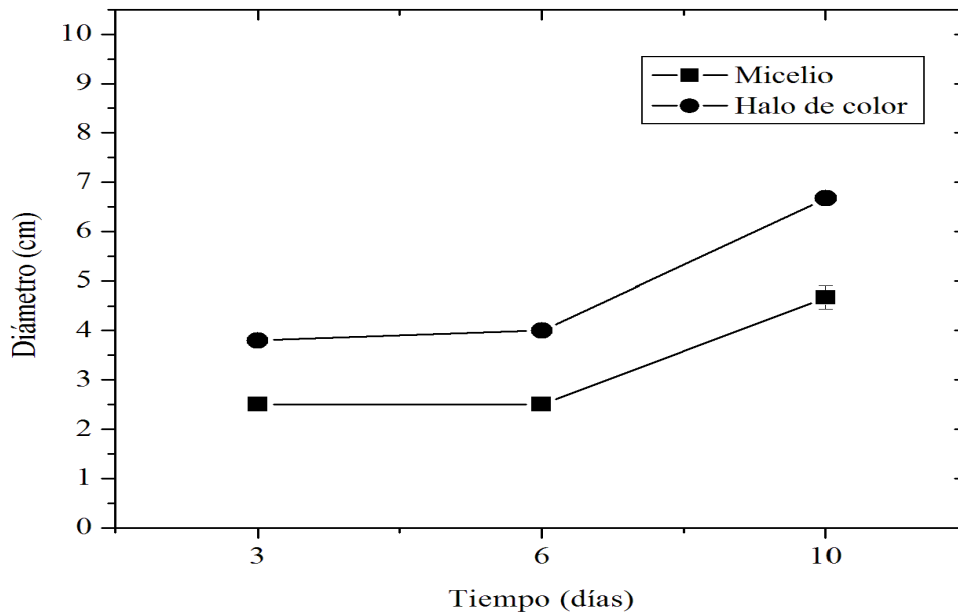


Figura 26. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

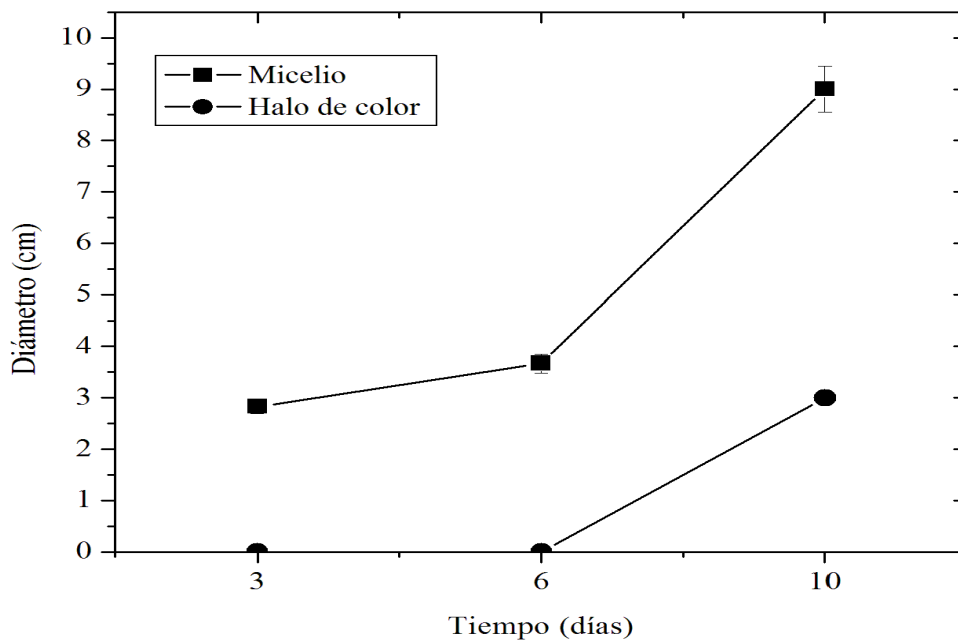


Figura 27. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

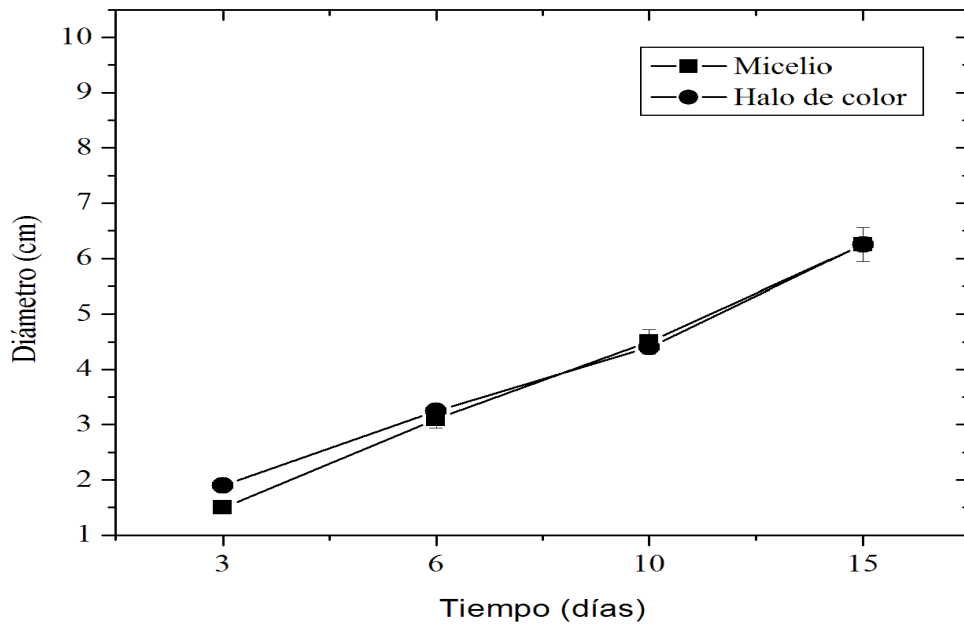


Figura 28. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-98 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

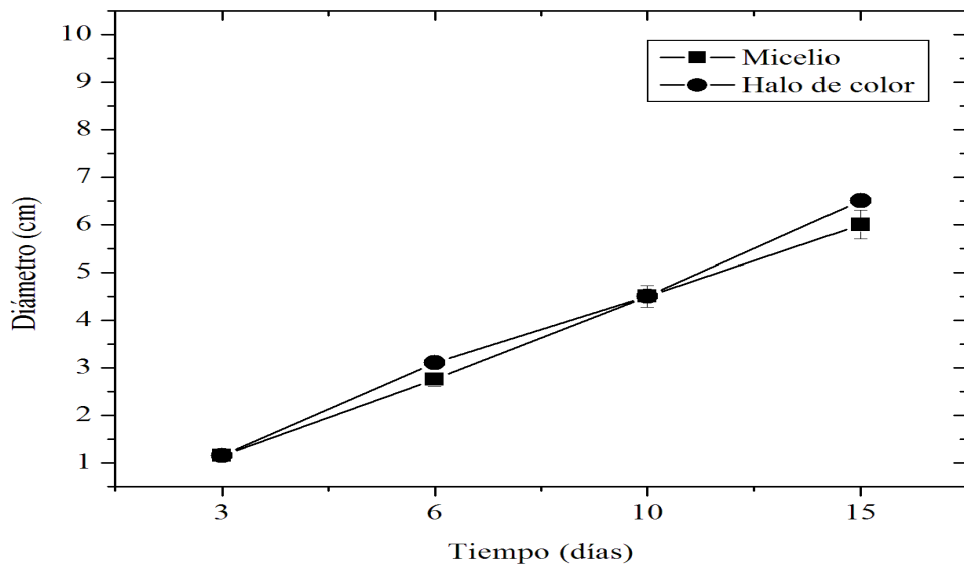


Figura 29. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-98 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

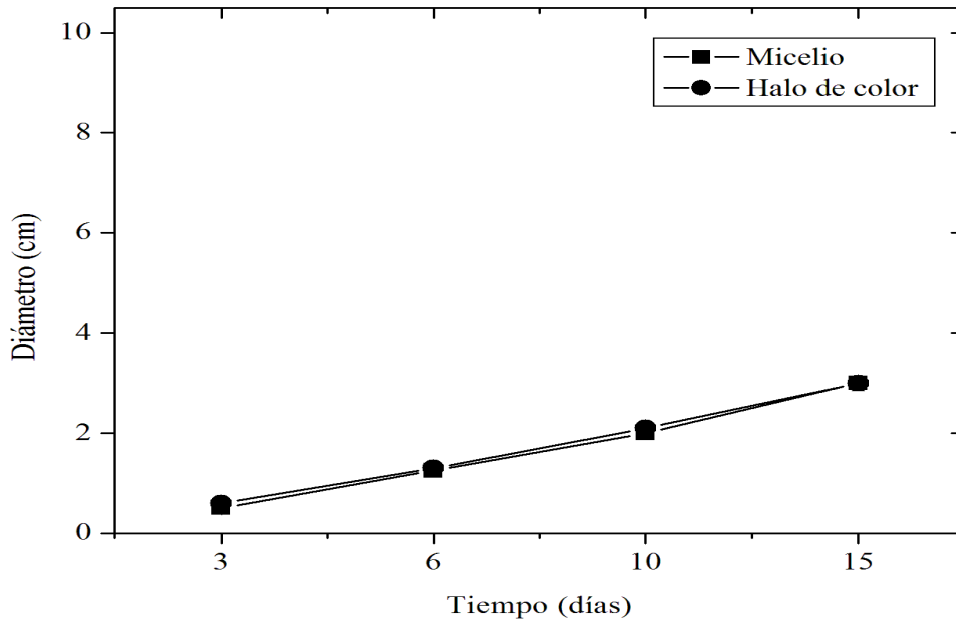


Figura 30. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-98 de *Pleurotus* sp. En medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

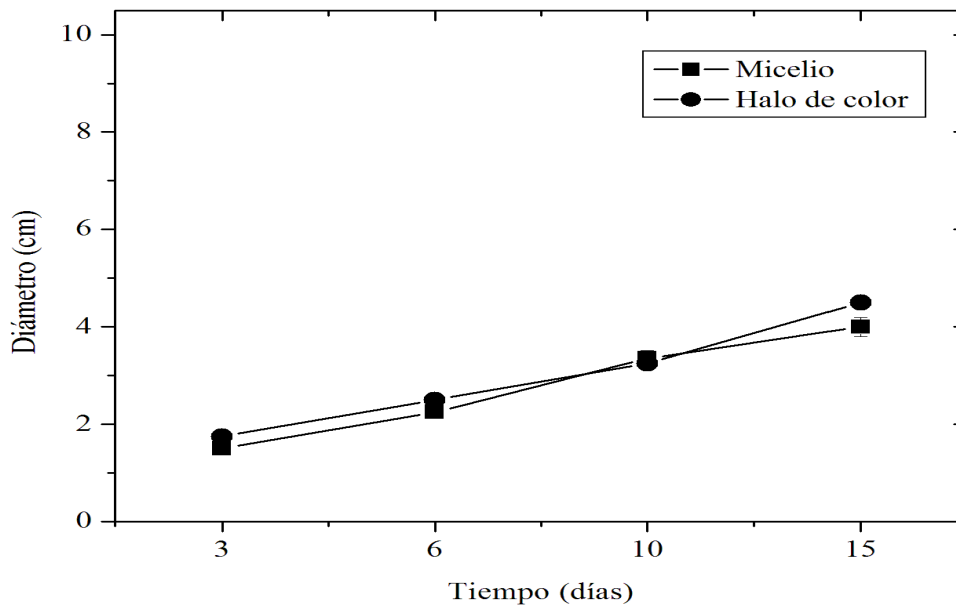


Figura 31. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-194 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

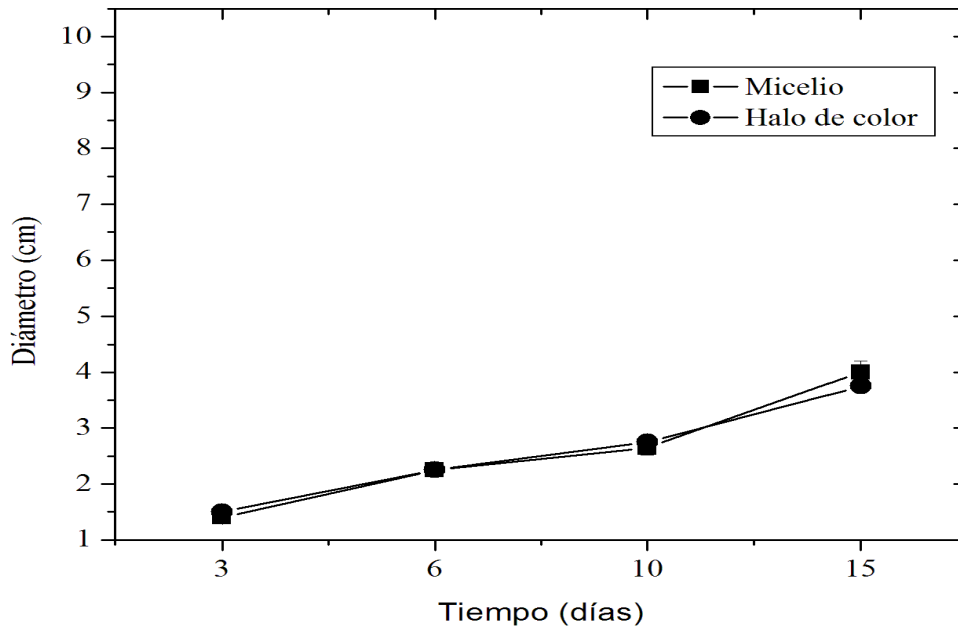


Figura 32. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-194 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

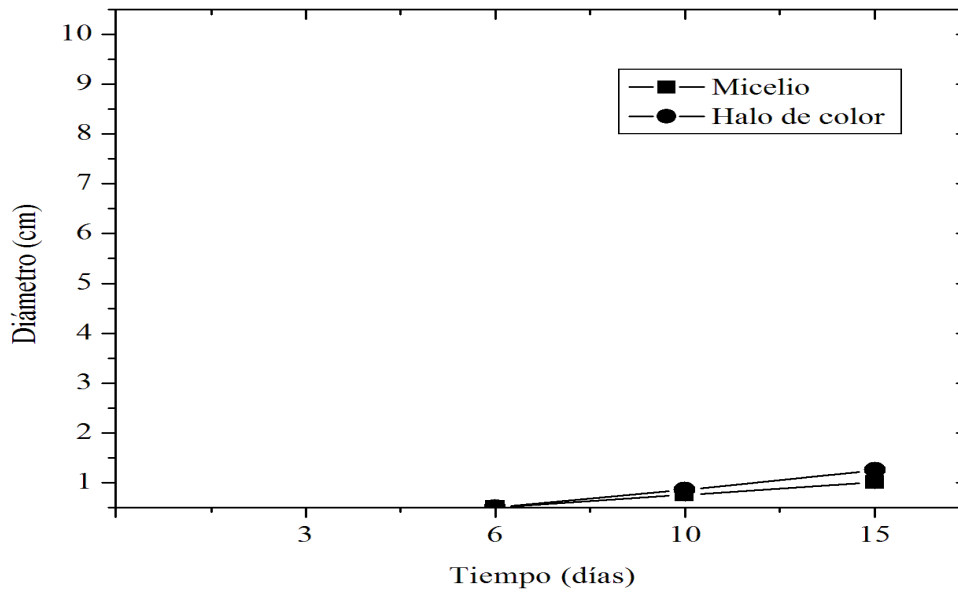


Figura 33. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-194 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

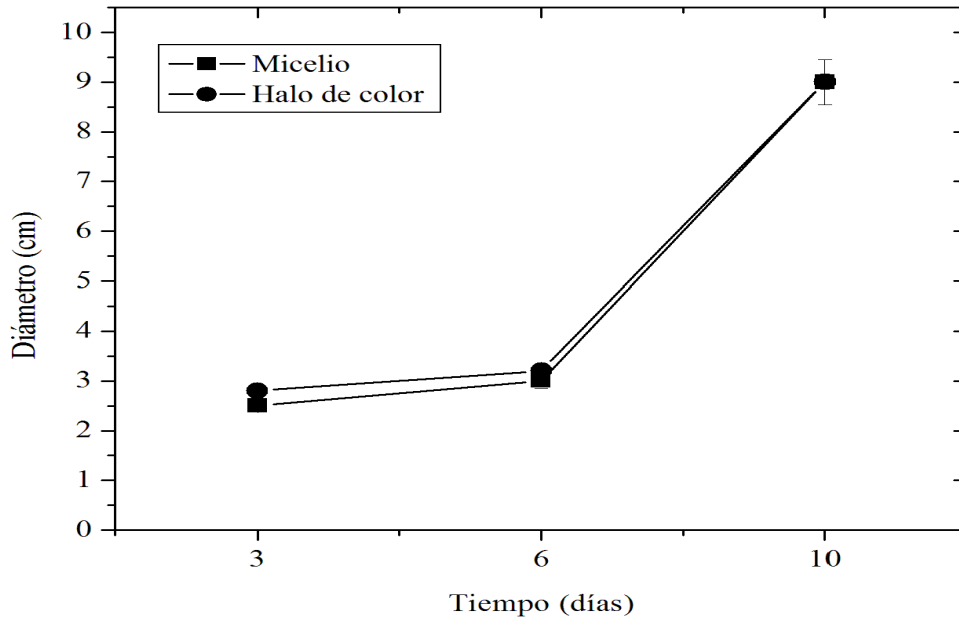


Figura 34. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-205 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

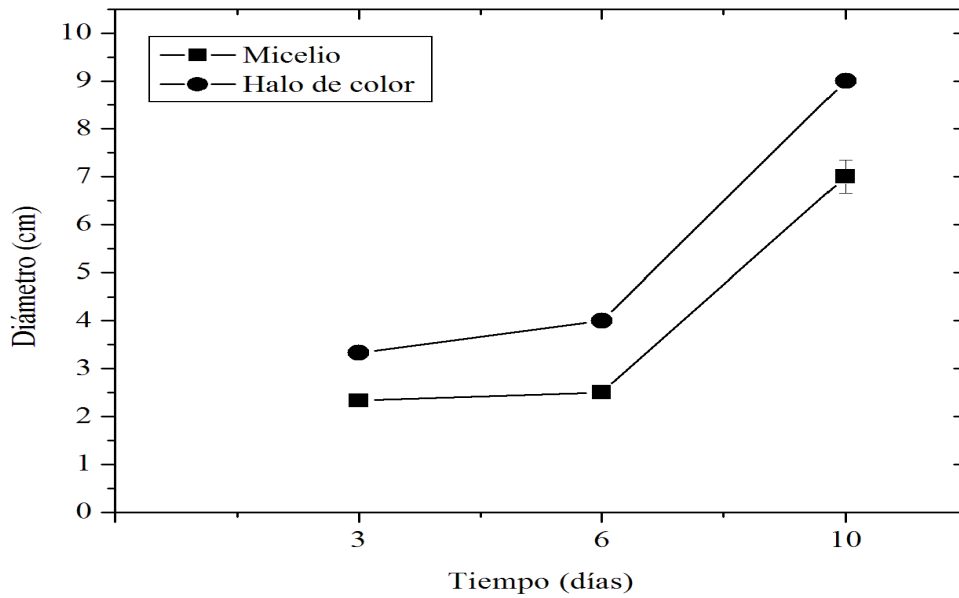


Figura 35. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-205 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

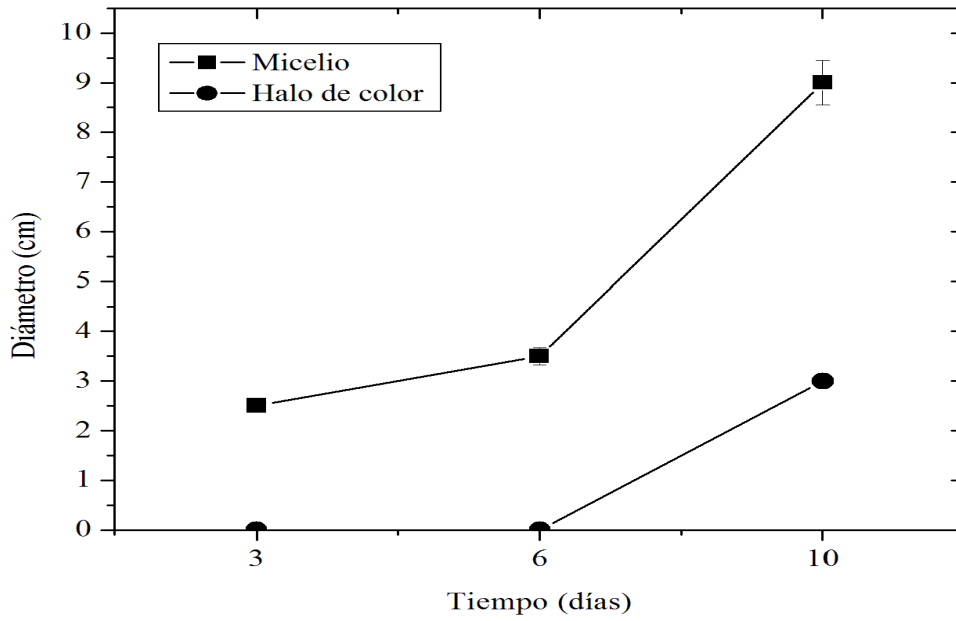


Figura 36. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-205 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

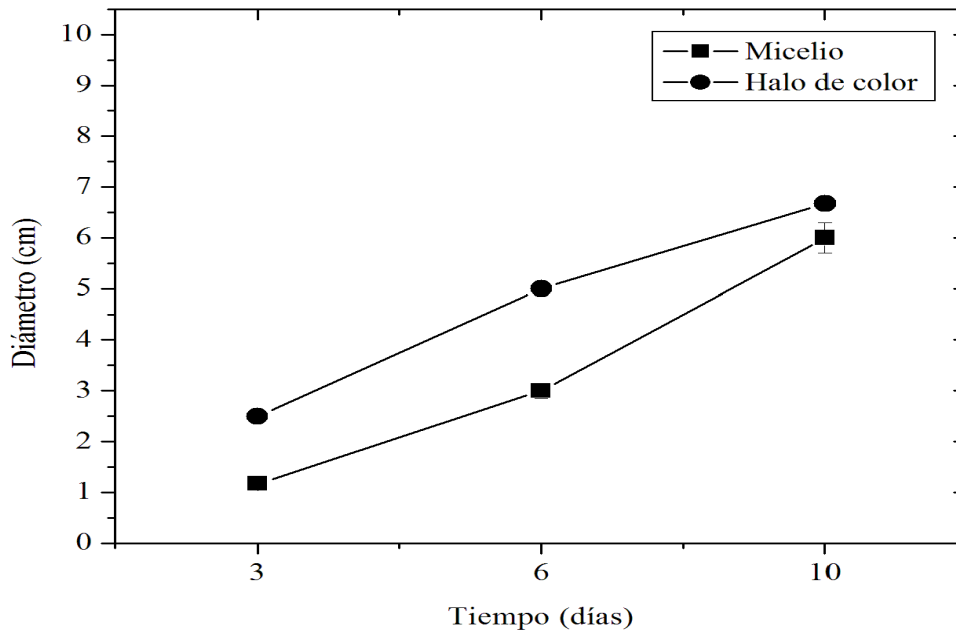


Figura 37. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-250 de *Coprinopsis* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

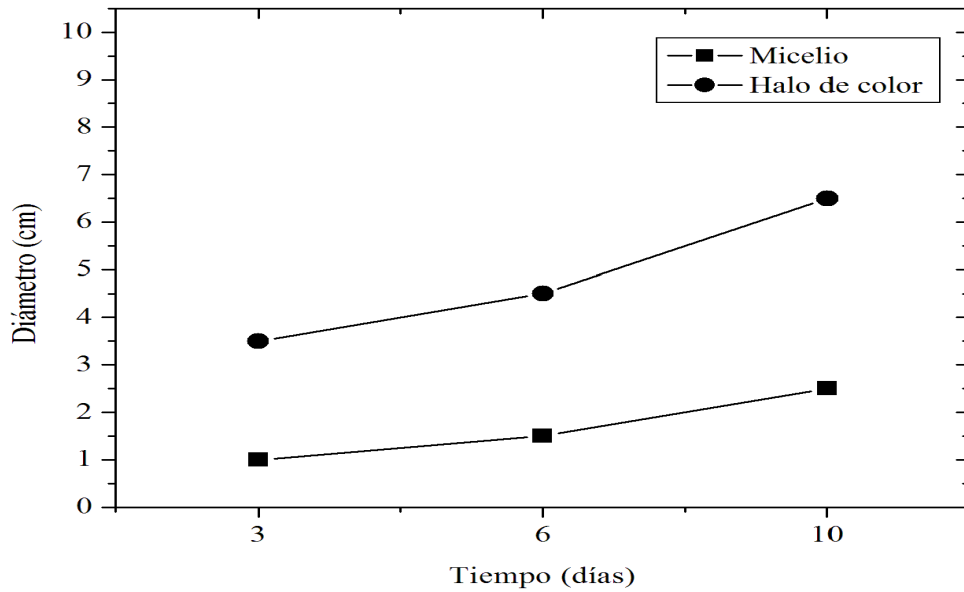


Figura 38. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-250 de *Coprinopsis* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

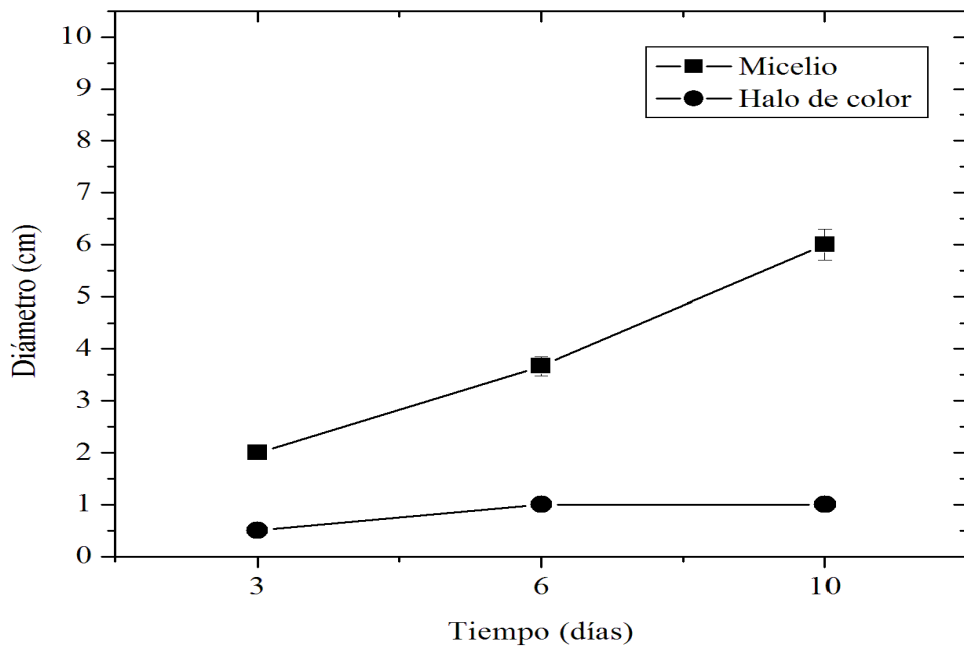


Figura 39. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-250 de *Coprinopsis* sp. en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

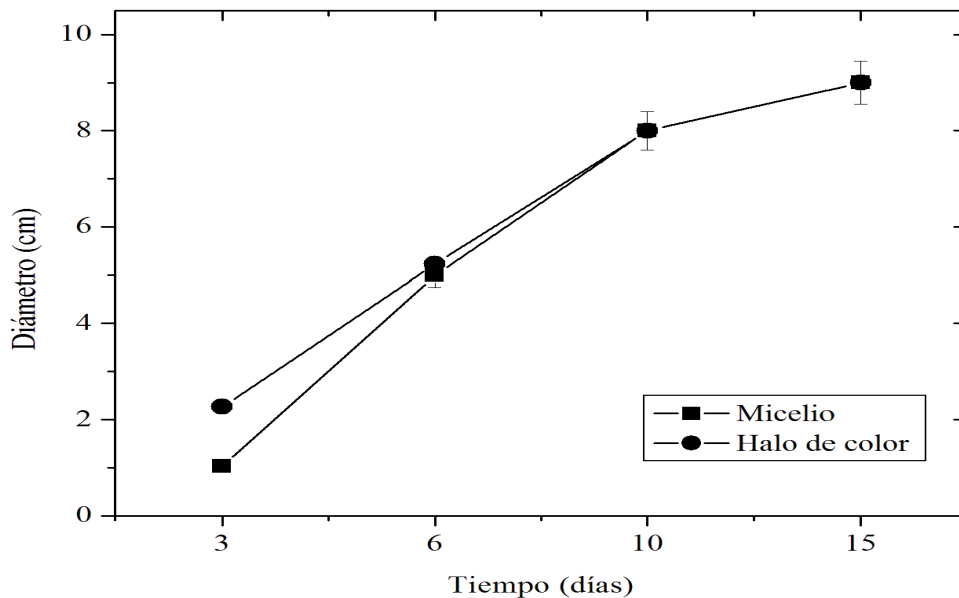


Figura 40. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

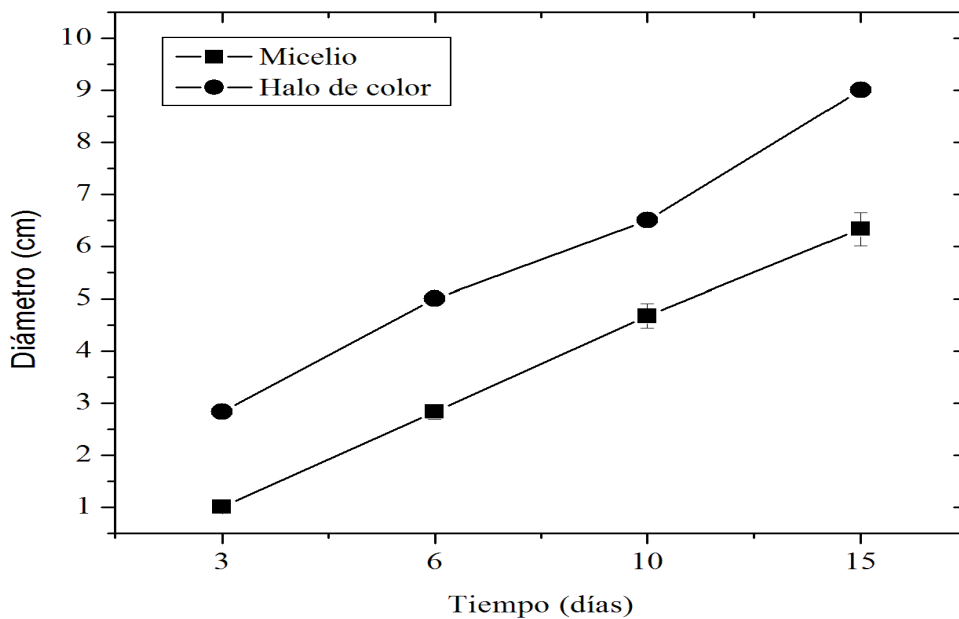


Figura 41. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

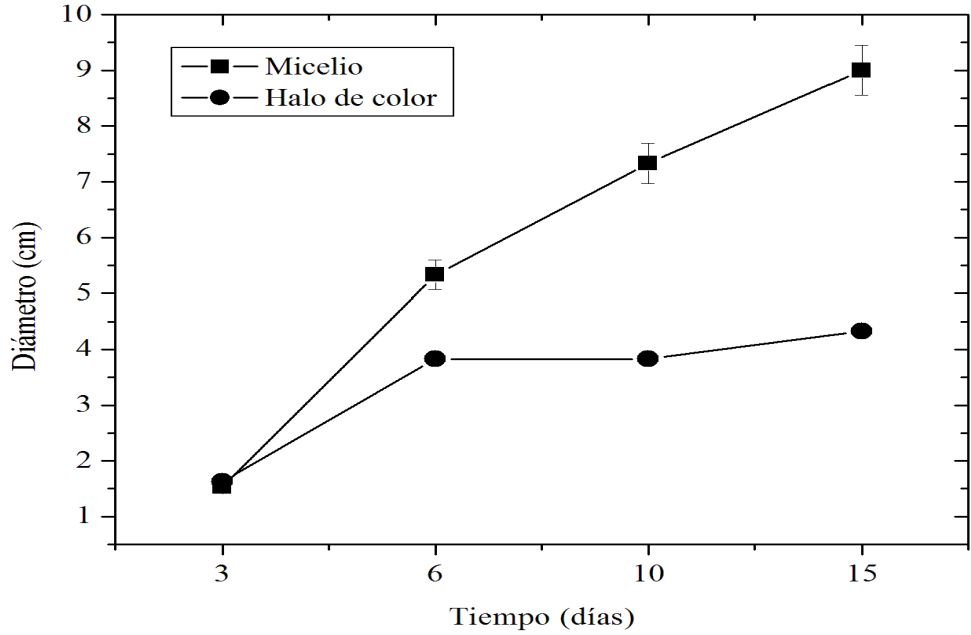


Figura 42. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

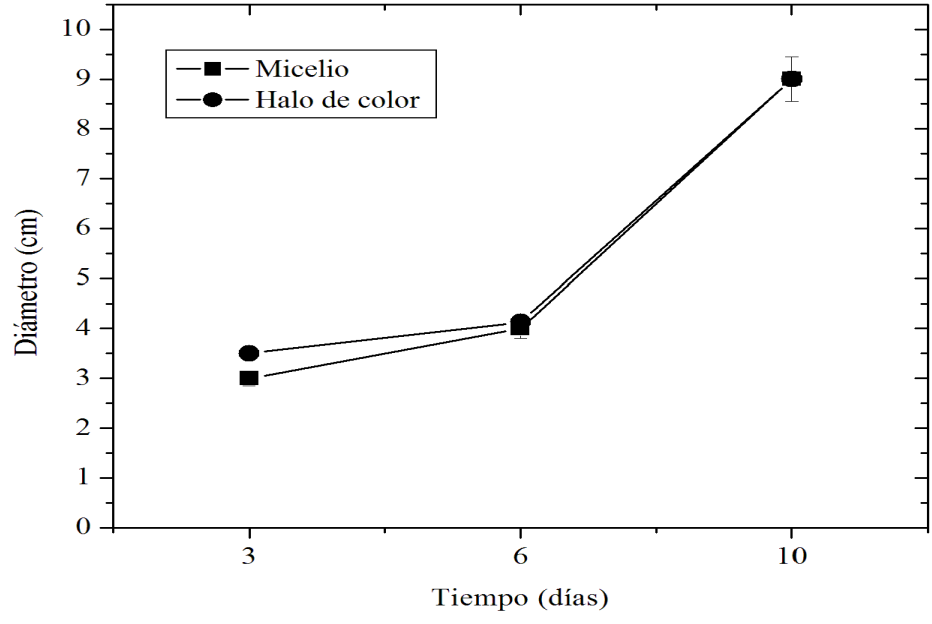


Figura 43. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

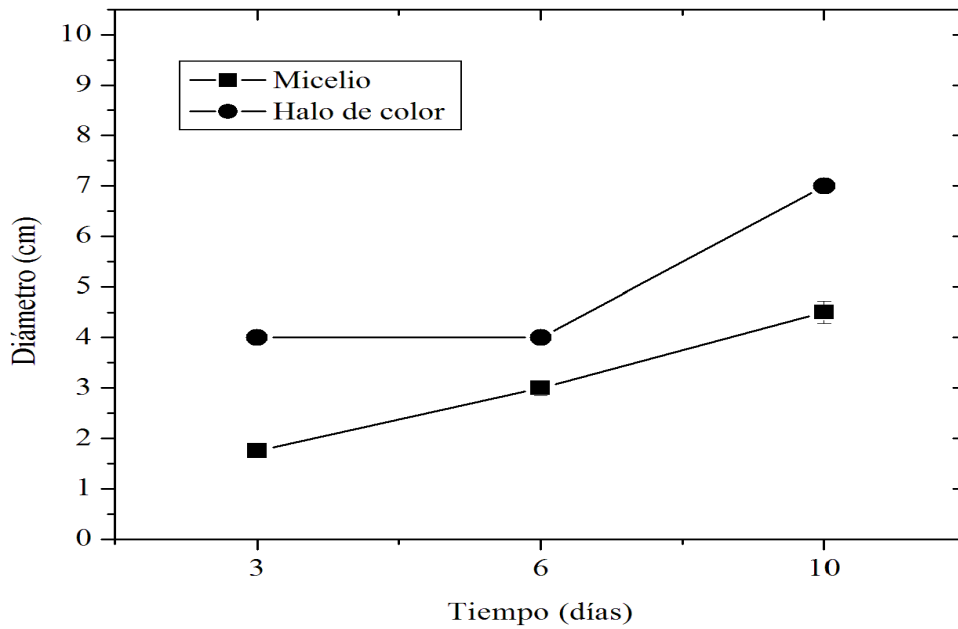


Figura 44. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

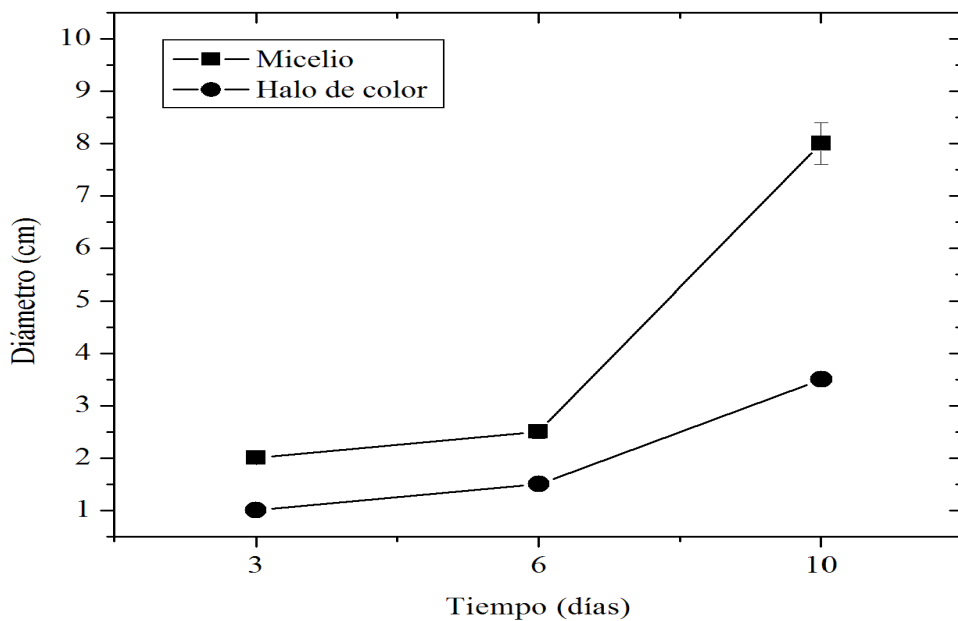


Figura 45. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

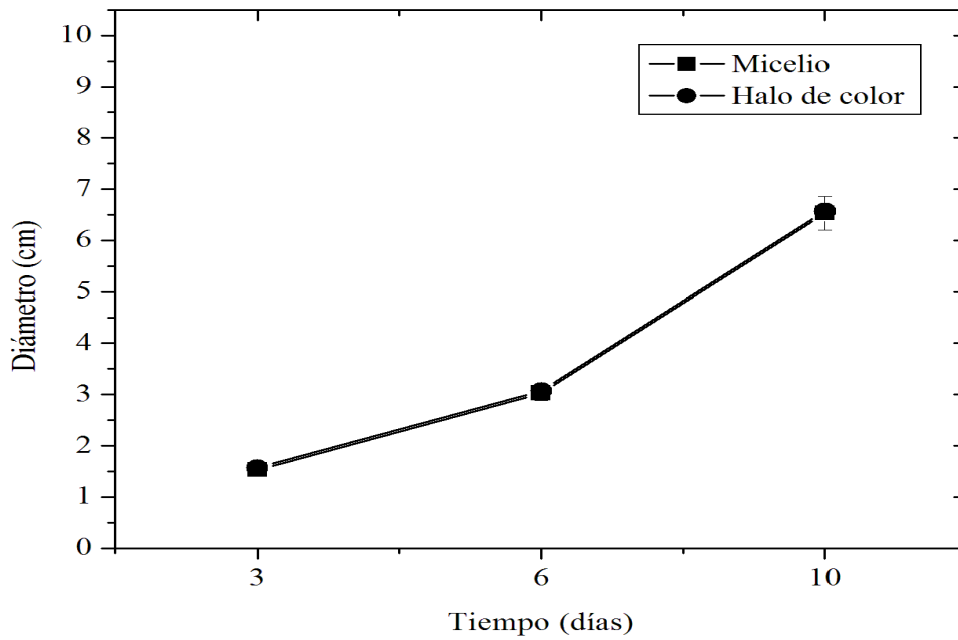


Figura 46. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

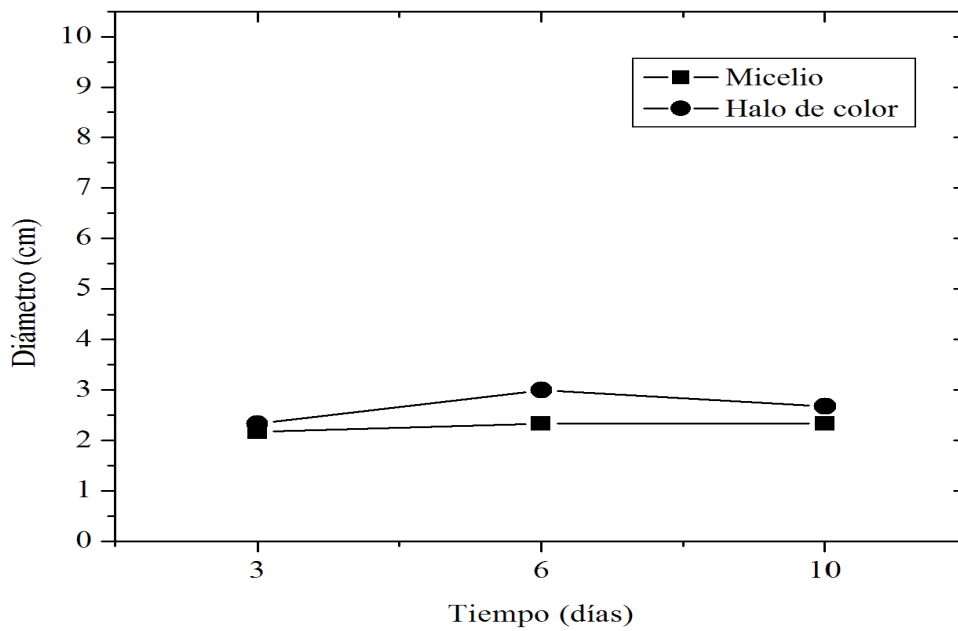


Figura 47. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

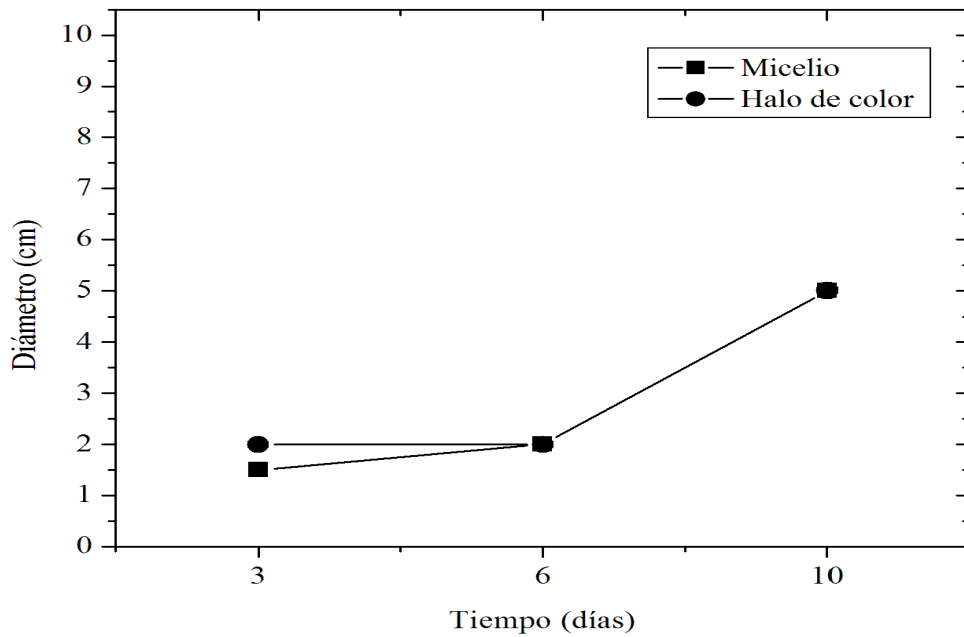


Figura 48. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

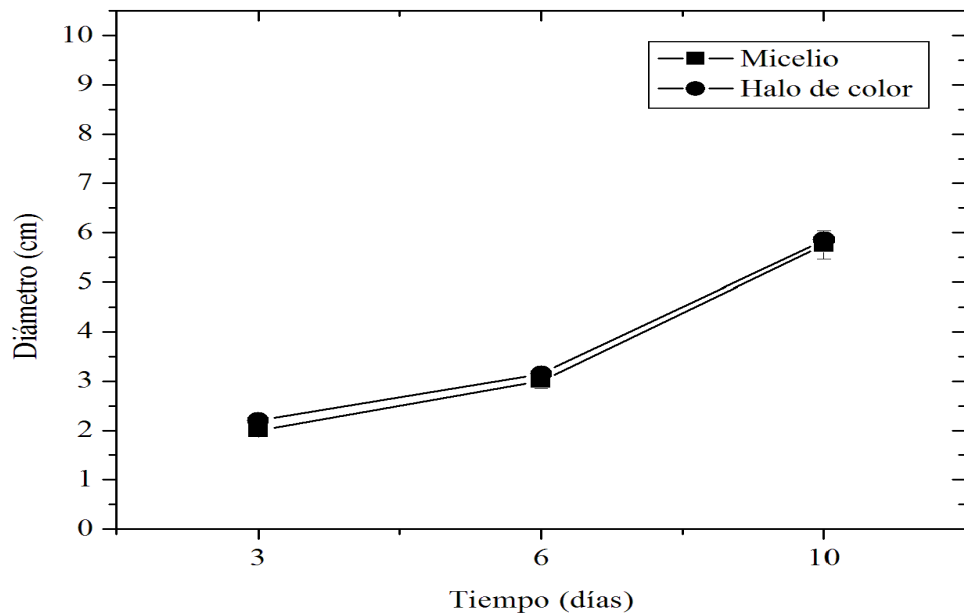


Figura 49. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-389 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

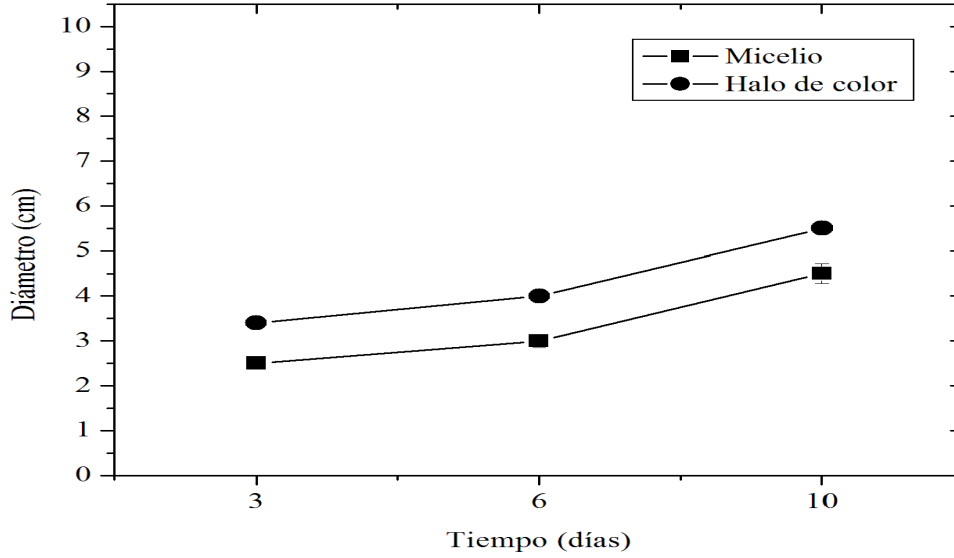


Figura 50. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-389 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

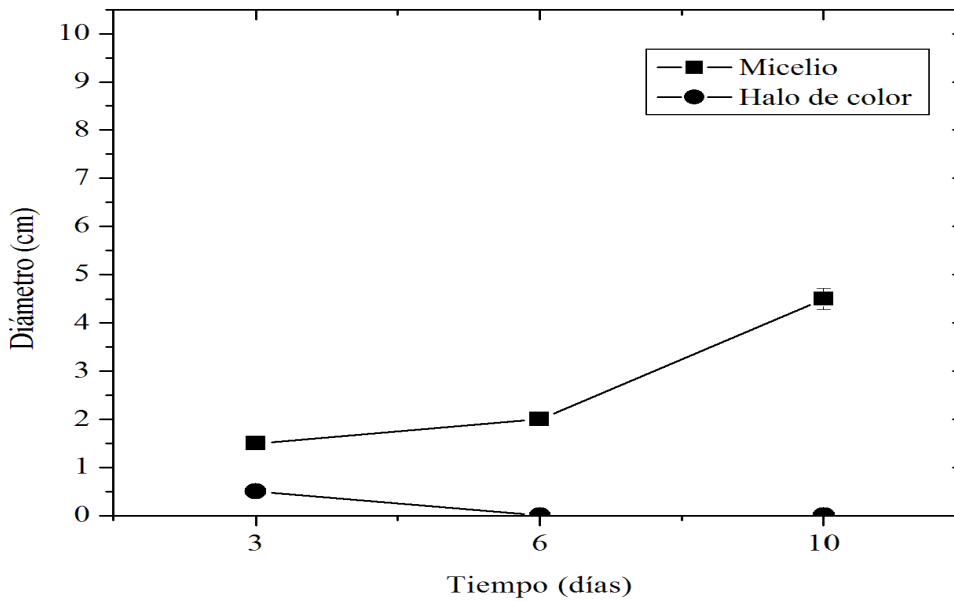


Figura 51. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-389 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

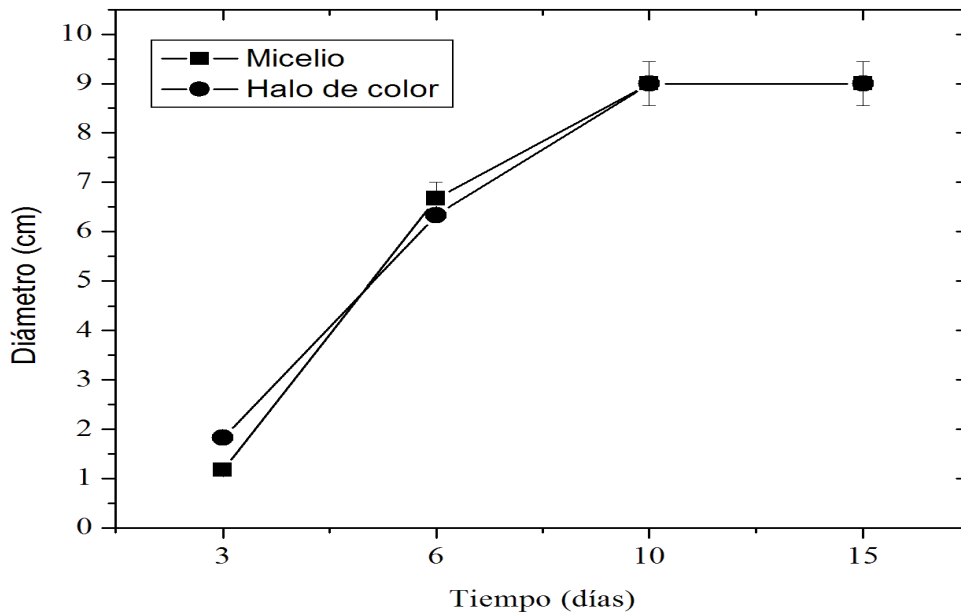


Figura 52. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-476 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

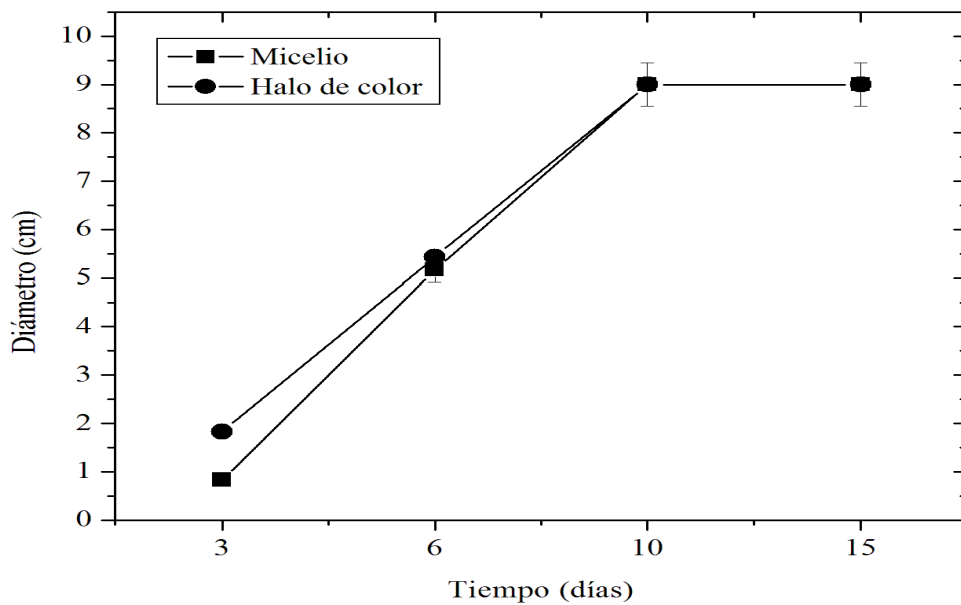


Figura 53. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-476 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

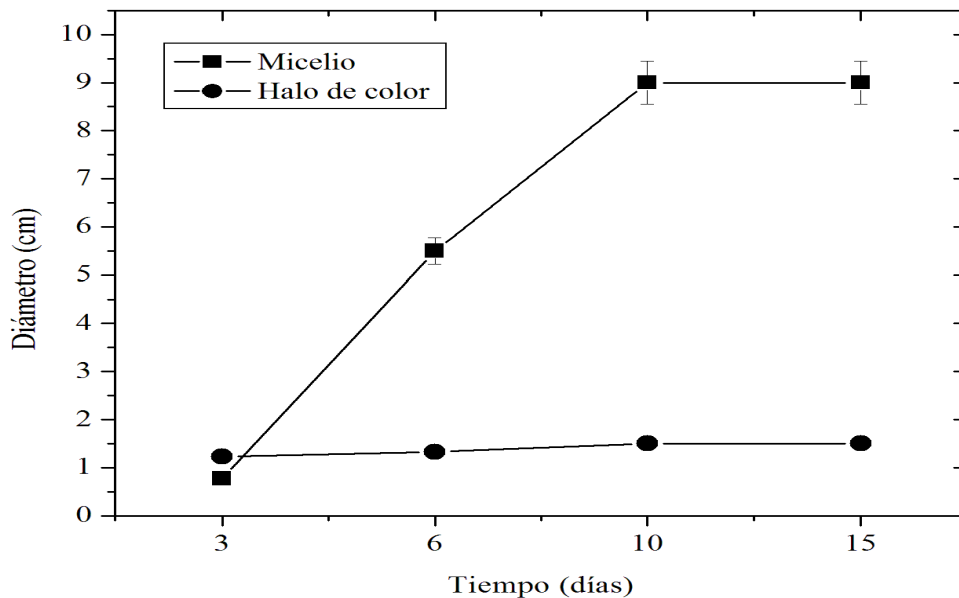


Figura 54. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-476 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

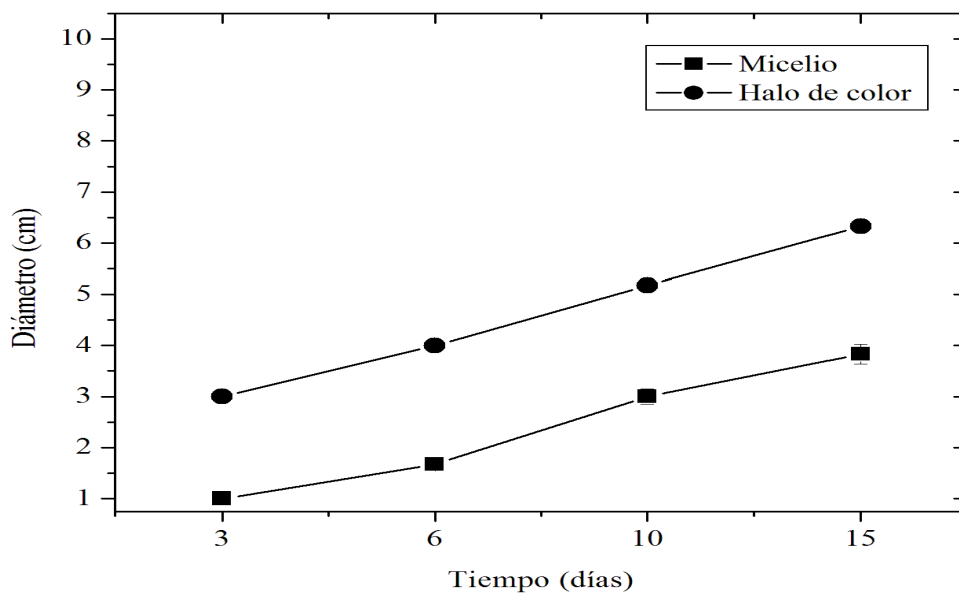


Figura 55. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-492 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático ABTS.

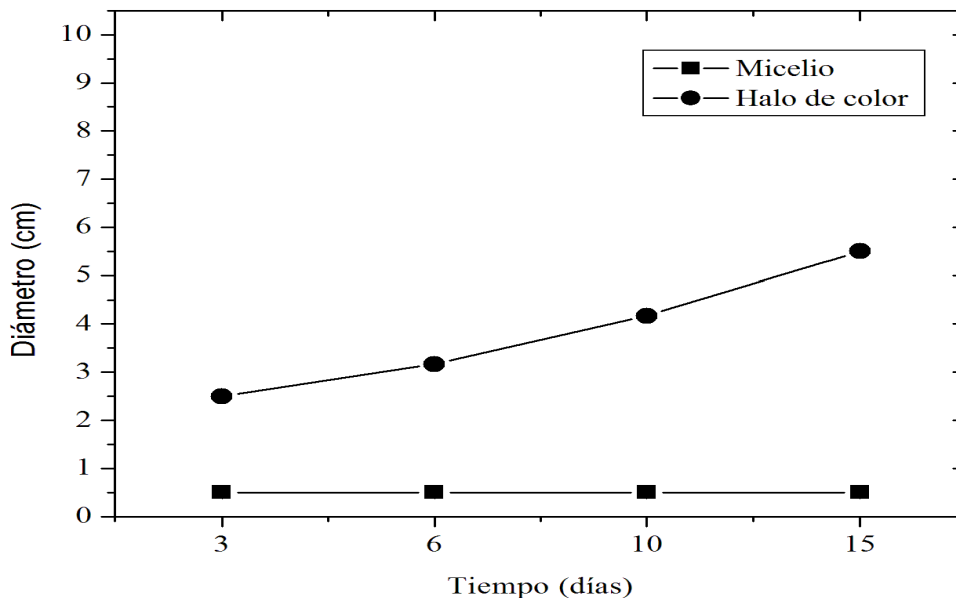


Figura 56. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-492 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático DMP.

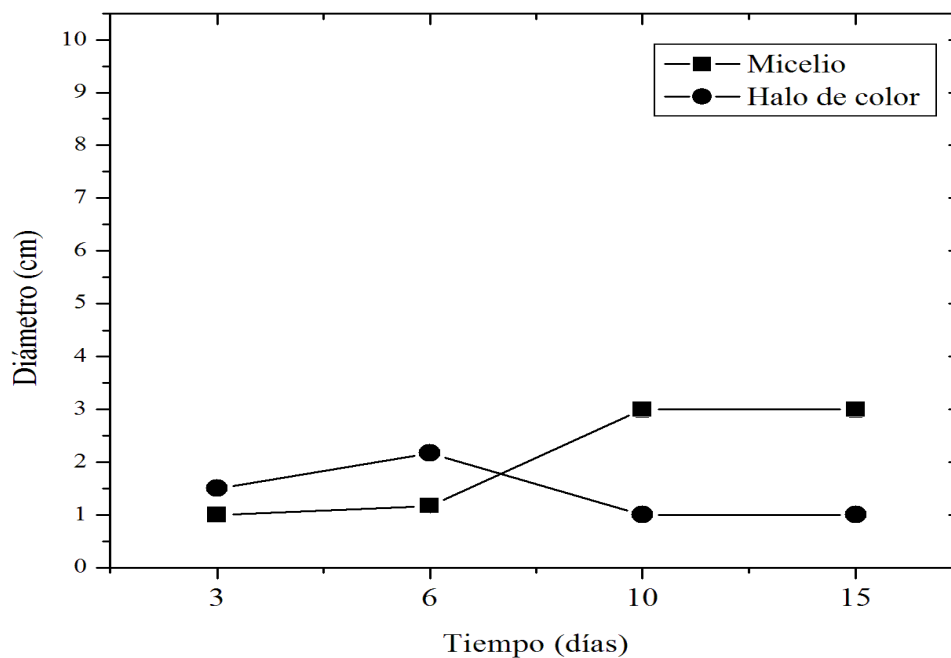


Figura 57. Crecimiento micelial y halo de color registrados por la cepa CP-492 de *Lentinula boryana* en medio de cultivo EMA adicionado con el sustrato enzimático guayacol.

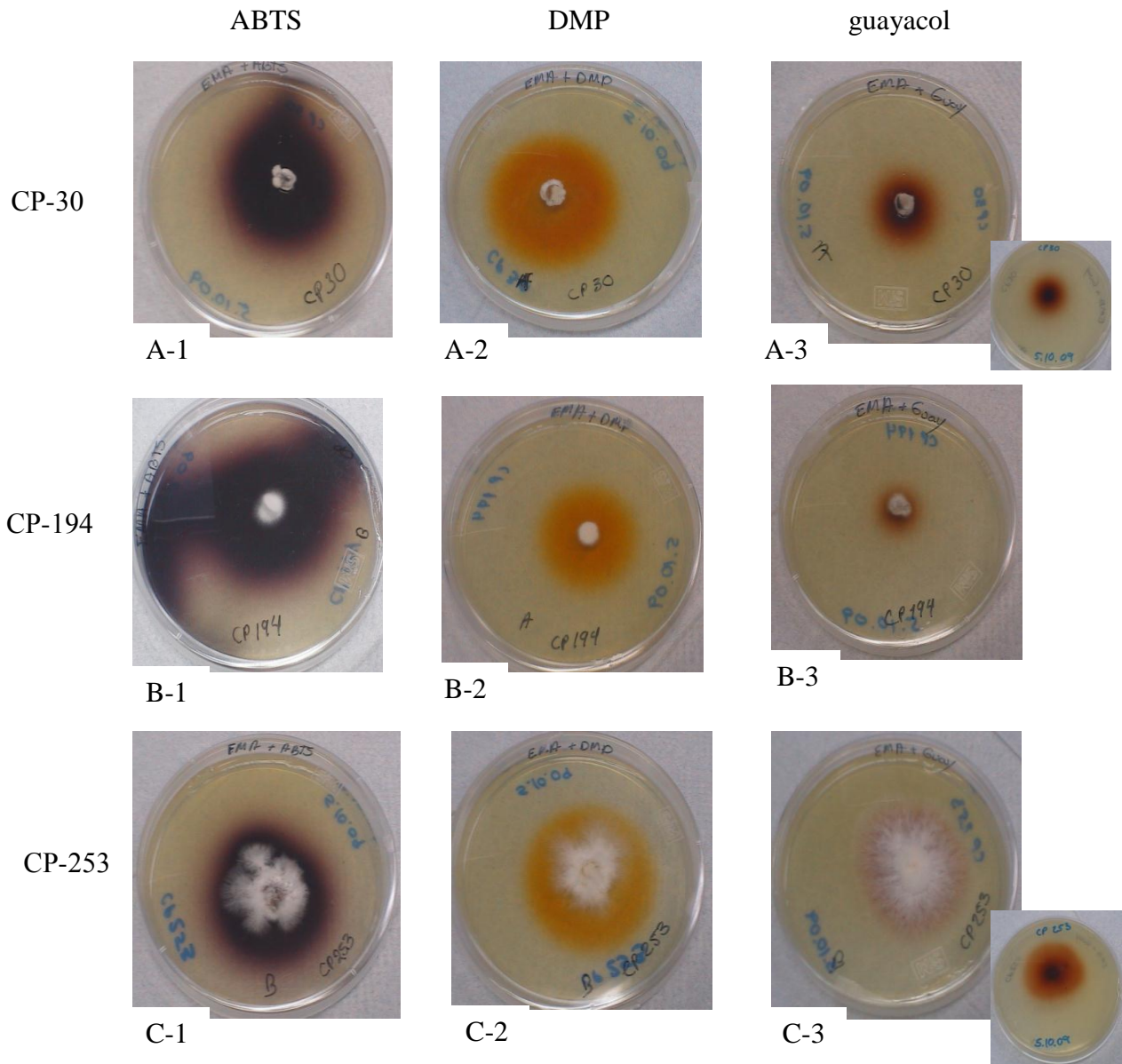


Figura 58. Cepas del género *Pleurotus* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A1: CP-30 (*Pleurotus levis*) con un halo intenso de color por la oxidación de ABTS. A-2: CP-30 con un halo intenso de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-30 con un halo de color por la oxidación de guayacol, el recuadro muestra el reverso de la placa. B-1: CP-194 (*Pleurotus* sp.) con un halo intenso de color por la oxidación de ABTS. B-2: CP-194 con un halo de color menor al de CP-30 por la oxidación de DMP. B-3: CP-194 con poca coloración por la oxidación de guayacol. C1: CP-253 (*Pleurotus djamor*) con un halo de color por la oxidación de ABTS solo un poco mayor al crecimiento micelial. C-2: CP-253 con un halo de color por la oxidación de DMP. C-3: CP-253 con poca coloración por la oxidación de guayacol, el recuadro muestra el reverso de la placa.

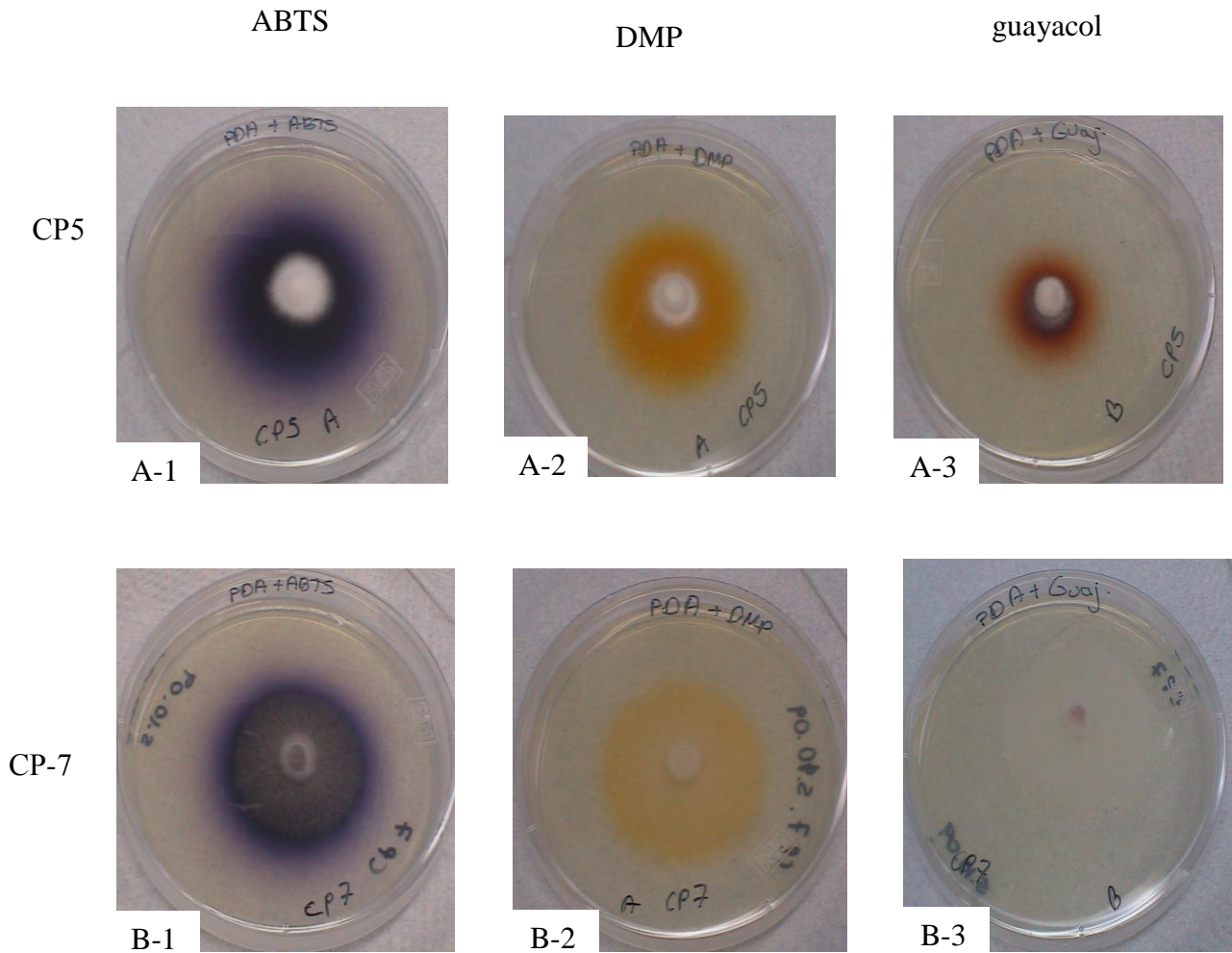


Figura 59. Cepas del género *Lentinula* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A-1: CP-5 (*Lentinula boryana*) con un halo de color por la oxidación de ABTS. A-2: CP-5 con un halo de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-5 con un halo de color por la oxidación de guayacol. B-1: CP-7 (*Lentinula edodes*) con un halo de color tenue por la oxidación de ABTS. B-2: CP-7 con un halo de color tenue por la oxidación de DMP. B-3: CP-7 sin presentar coloración en presencia de guayacol.

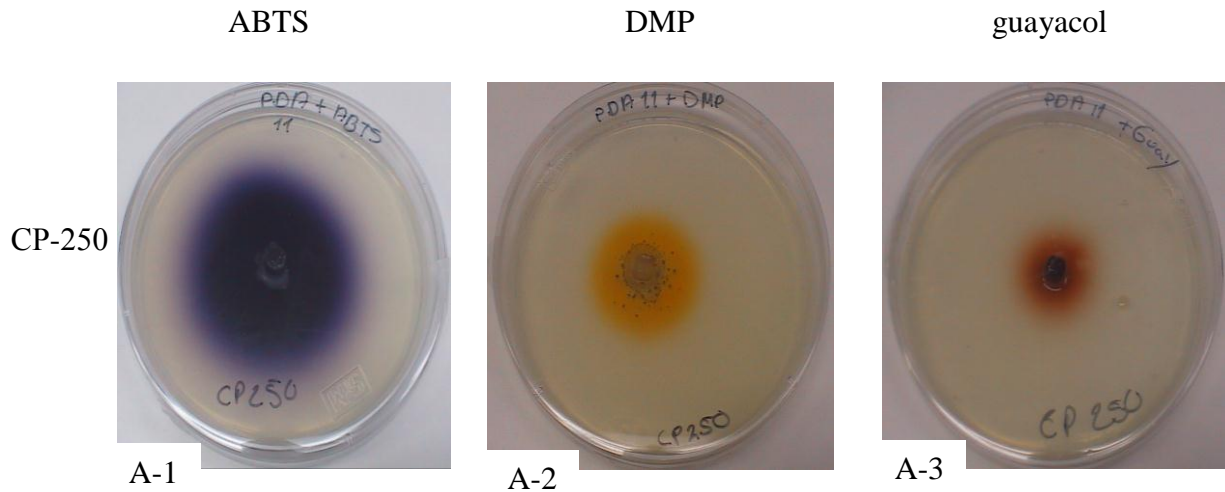


Figura 60. Cepa del género *Coprinopsis* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A-1: CP-520 (*Coprinopsis* sp.) con un halo de color intenso por la oxidación de ABTS. A-2: CP-250 con un halo de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-250 con un halo de color por la oxidación de guayacol.

CP-476

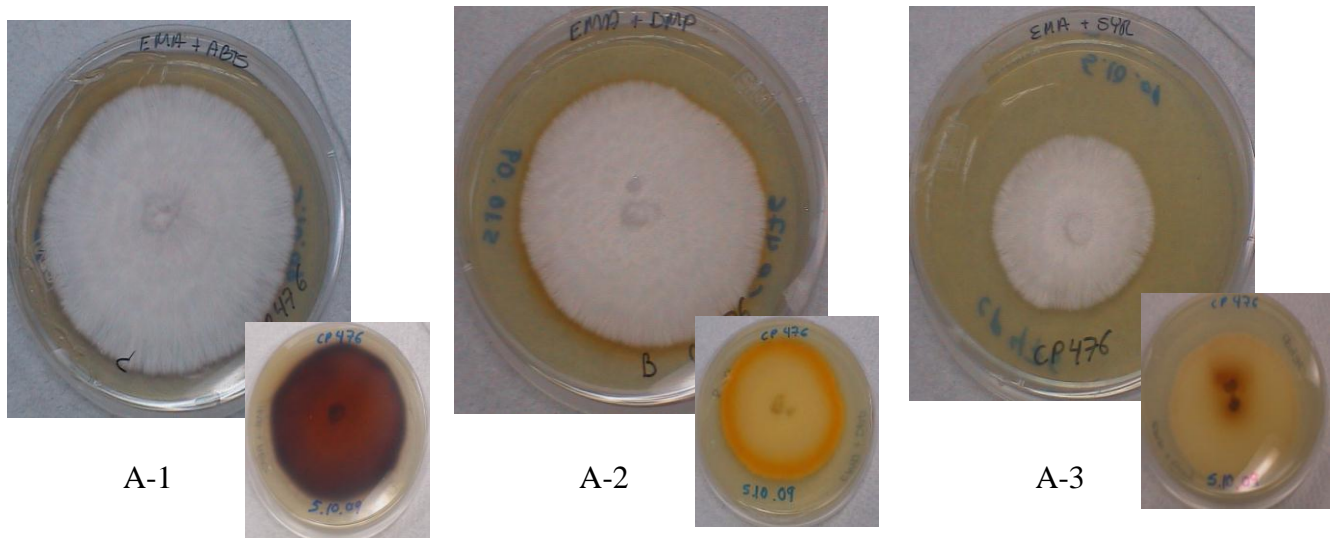


Figura 61. Cepa de *Ganoderma lucidum* a seis días de crecimiento en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubada a 22°-26°C. A-1: CP-476 (*Ganoderma lucidum*) con un halo de color por la oxidación de ABTS. A-2: CP-476 con un halo de color por la oxidación de DMP. A-3: CP-476 con un halo de color por la oxidación de guayacol.

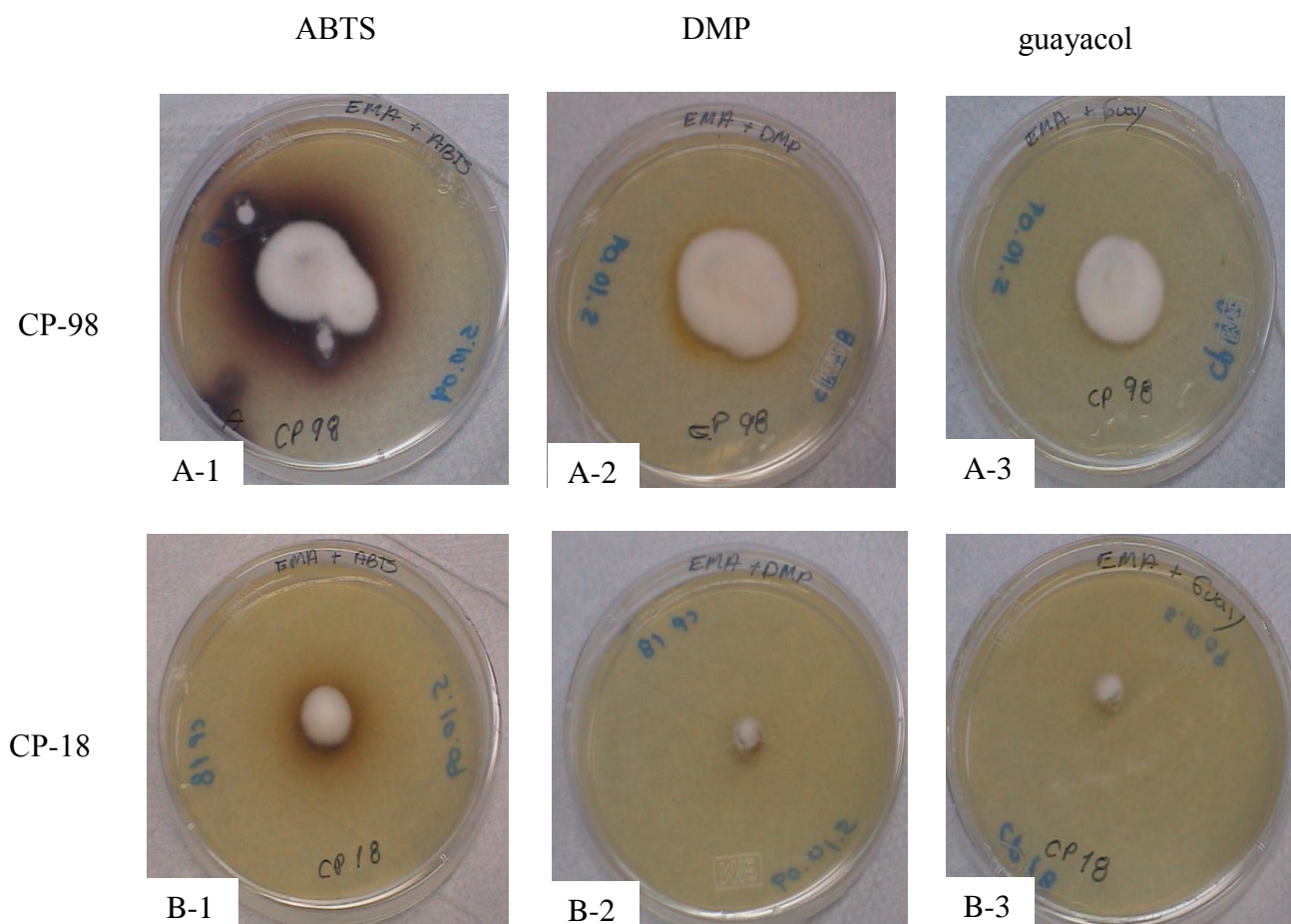


Figura 62. Cepas de *Pleurotus* a seis días de cultivo en medio EMA con diferentes sustratos enzimáticos, incubados a 22°-26°C. A-1: CP-98 (*Pleurotus* sp.) con un halo de color tenue por la oxidación de ABTS. A-2: CP-98 con un halo de color pequeño y tenue por la oxidación de DMP. A-3: CP-98 sin colorear el medio adicionado con guayacol. B-1: CP-18 (*Pleurotus cystidiosus*.) con poca coloración del medio por la oxidación de ABTS. B-2: CP-18 sin colorear el medio adicionado con DMP. B-3: CP-18 sin colorear el medio adicionado con guayacol.

Determinación del pH de los medios de cultivo. El análisis de los medios de cultivos colonizados por las cepas en estudio con micelio, demostró que no existen cambios importantes de pH al inicio y al final del tiempo de incubación. Así como, tampoco existen cambios importantes con los diferentes sustratos enzimáticos adicionados (Cuadro 5). Las variaciones notorias de pH estuvieron determinadas por el organismo en particular, más que por las condiciones del cultivo. De tal manera que el medio de cultivo con cepas de *Pleurotus* se mantuvo con valores de pH muy similares a los pH iniciales.

Cuadro 5. Valores de pH del medio de cultivo adicionado con diferentes sustratos enzimáticos (temperatura: 24.2°-24.7°C) antes y después de su colonización por el micelio de los hongos comestibles estudiados.

Muestra (Medios de cultivo después del crecimiento micelial)			Muestra (Medios de cultivo después del crecimiento micelial)		
Sustrato enzimático	pH		Sustrato enzimático	pH	
CP-5	ABTS	4.16	CP-194	ABTS	5.02
	DMP	4.20		DMP	5.05
	Guayacol	4.44		Guayacol	4.96
CP-7	ABTS	3.79	CP-250	ABTS	7.34
	DMP	3.69		DMP	6.89
	Guayacol	3.72		Guayacol	7.63
CP-18	ABTS	5.01	CP-253	ABTS	5.61
	DMP	5.06		DMP	5.42
	Guayacol	4.96		Guayacol	5.41
CP-30	ABTS	5.13	CP-476	ABTS	4.60
	DMP	4.83		DMP	4.29
	Guayacol	4.88		Guayacol	4.31
CP-98	ABTS	4.78	CP-492	ABTS	4.28
	DMP	4.81		DMP	5.47
	Guayacol	4.83		Guayacol	4.71
Muestra (Medios de cultivo antes de inocular)		pH	Muestra (Medios de cultivo antes de inocular)		pH
EMA (no estéril)		5.00	PDA alcalino + ABTS		10.10
PDA (no estéril)		5.82	EMA + DMP		4.90
PDA alcalino (no estéril)		11.00	PDA + DMP		5.55
EMA (estéril)		4.82	PDA + DMP		10.20
PDA (estéril)		5.71	EMA + guayacol		4.77
PDA alcalino (estéril)		10.57	PDA + guayacol		5.55
EMA + ABTS		4.69	PDA alcalino + guayacol		10.15
PDA + ABTS		5.40			

El medio de cultivo con cepas de *Ganoderma* se acidificó ligeramente, aunque manteniendo los valores de pH muy similares a los iniciales. Y por último, el medio de cultivo

con cepas de *Lentinula*, al igual que el medio de cultivo de *Coprinopsis* sp. se acidificaron más que los que se emplearon para cultivar cepas de *Pleurotus* o *Ganoderma*.

Evaluación cuantitativa. La evaluación cuantitativa demostró la capacidad de los hongos comestibles en la producción de actividad enzimática con diferencia estadísticamente significativa, utilizando el análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones. Los resultados demostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa en la producción de actividad de lacasas con respecto al control, para las cepas: CP-7 de *Lentinula edodes*, CP-30 de *Pleurotus levis*, CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, CP-98 de *Pleurotus* sp., CP-194 de *Pleurotus* sp., CP-253 de *Pleurotus djamor*, CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* y CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*. Aún para la cepa CP-205 de *Ganoderma lucidum* que produjo muy poca actividad de lacasas, se observó una diferencia estadísticamente significativa en dos momentos de su desarrollo (ANEXO II).

Algunas de las cepas de hongos estudiadas, mostraron actividad enzimática con un pico inicial de actividad durante los primeros días y posteriormente una tendencia decreciente de la actividad, como en el caso de las cepas CP-194 de *Pleurotus* sp. y CP-98 de *Pleurotus* sp. Otras cepas no mostraron actividad en los primeros días, pero sí en días posteriores, como en el caso de la cepa CP-7 de *Lentinula edodes*, y otras más alcanzaron un máximo de actividad casi desde el inicio variando alrededor de ese valor, como en el caso de las cepas CP-267 de *Pleurotus pulmonarius*, CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* y CP-30 de *Pleurotus levis*.

Así mismo, el comportamiento para cada cepa fue diferente en cuanto a la cantidad de picos de actividad registrados; en algunos casos, solo se observó un pico de producción de actividad, como en el caso de las cepas CP-7 de *Lentinula edodes* y CP-98 de *Pleurotus ostreatus*, mientras que en otros se observaron varios picos de actividad durante el tiempo de evaluación, como en el caso de las cepas CP-30 de *Pleurotus levis*, CP-50 de *Pleurotus ostreatus* o CP-267 de *Pleurotus pulmonarius*.

Tres de las cepas evaluadas presentaron actividad de lacasas muy alta, superior a 1,000 U/ml, CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* y CP-30 de *Pleurotus levis*, el resto de las cepas evaluadas presentaron actividad de lacasas menor a 100 U/ml.

La cepa CP-30 de *Pleurotus levis* presentó un pico inicial de mucha actividad enzimática (1,000 U/ml) para el día 4, el cual decreció al día 5 y posteriormente mostró una tendencia creciente que alcanzó nuevamente las 1,000 U/ml el día 19. Después, se registró incremento y decremento de la actividad enzimática, hasta alcanzar el tercer pico de aproximadamente 1,000 U/m el día 29 (Figura 64).

Dos cepas del género *Pleurotus* mostraron actividad de lacasas superior a las demás cepas evaluadas. La cepa CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* presentó dos picos de producción enzimática muy marcados. El primero fue al día 5 con una producción de 2,500 U/ml, mientras que el segundo se extendió de los días 9-12 con 1,500 U/ml (Figura 70). La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* también mostró dos picos de producción. El primero al día 5 con 3,000 U/ml y el segundo al día 8 con 4,000 U/ml, lo que representó la máxima producción de lacasas registrada en este estudio. (Figura 65).

El resto de las cepas de *Pleurotus* mostraron una actividad que varió entre 10-50 U/ml. La cepa CP-194 de *Pleurotus* sp., presentó el pico máximo de producción en el día 7 con un poco más de 40 U/ml, para luego decrecer y mantenerse cerca de las 10 U/ml (Figura 67). De igual manera, la cepa CP-98 (*Pleurotus cystidiosus*) presentó el pico de máxima producción en el día 4 con 30 U/ml para después decrecer y mantenerse cerca de las 15 U/ml (Figura 66). La cepa CP-253 de *Pleurotus djamor* alcanzó a partir del día 3, una producción de 30 U/ml y se mantuvo más o menos constante en ese nivel (Figura 69). Por último, la cepa CP-328 empezó sin presentar actividad, incrementándose gradualmente hasta el día 6 y logrando su pico máximo de producción en el día 12, con 50 U/ml. Se registraron pequeñas altas y bajas de producción de lacasas entre 40-50 U/ml, a excepción de los días 19 y 28 en los que se registraron picos a la baja de 10 U/ml (Figura 71). Las cepas de *Ganoderma* no presentaron halos de coloración en la evaluación cualitativa y tampoco mostraron producción de lacasas en el medio líquido. La producción de lacasas registrada para la cepa CP-205 fue muy baja, menor a 1 U/ml (Figura 68). De igual manera, la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* mostró baja producción de actividad con respecto al resto de las cepas, alcanzando un pico máximo de producción de 20 U/ml en el día 13 (Figura 63). Los datos de las actividades registradas para todas las cepas de hongos comestibles evaluados se muestran en el ANEXO I.

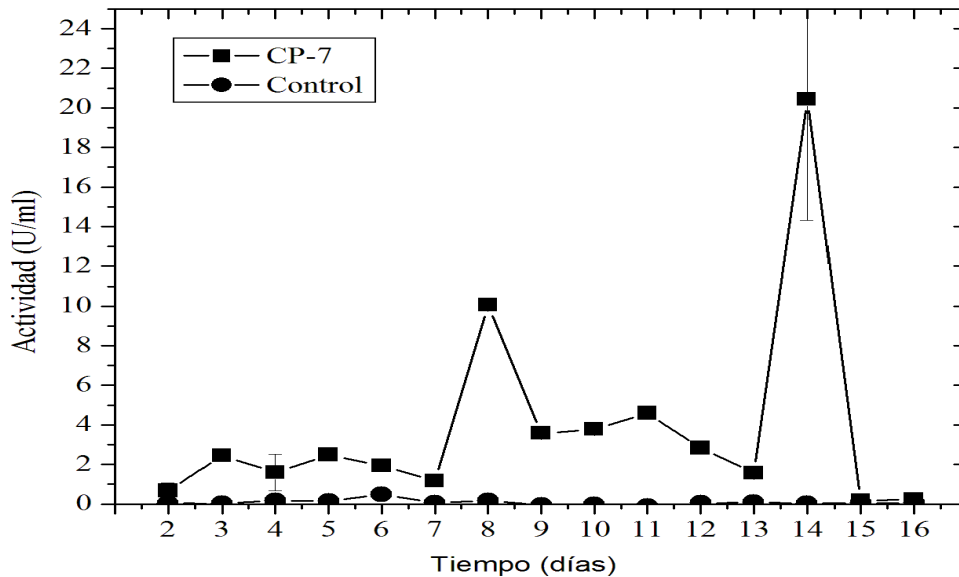


Figura 63. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

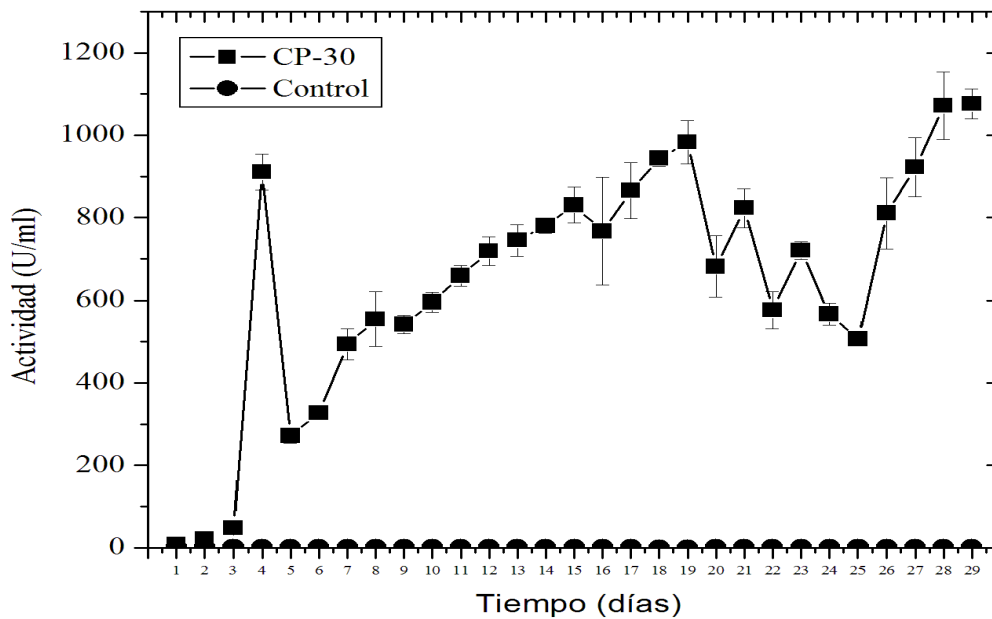


Figura 64. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM.

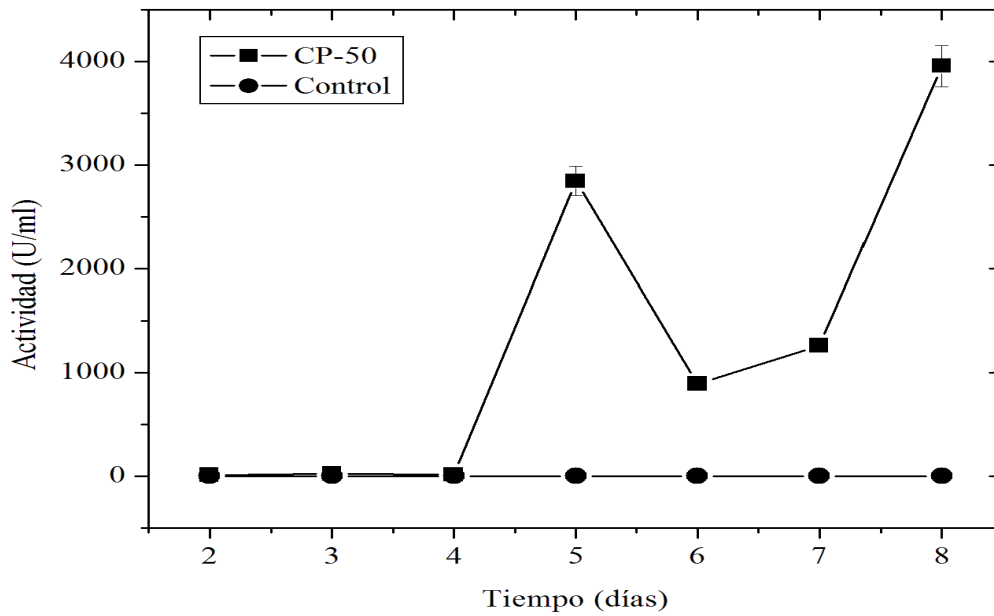


Figura 65. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMB adiconadeo con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

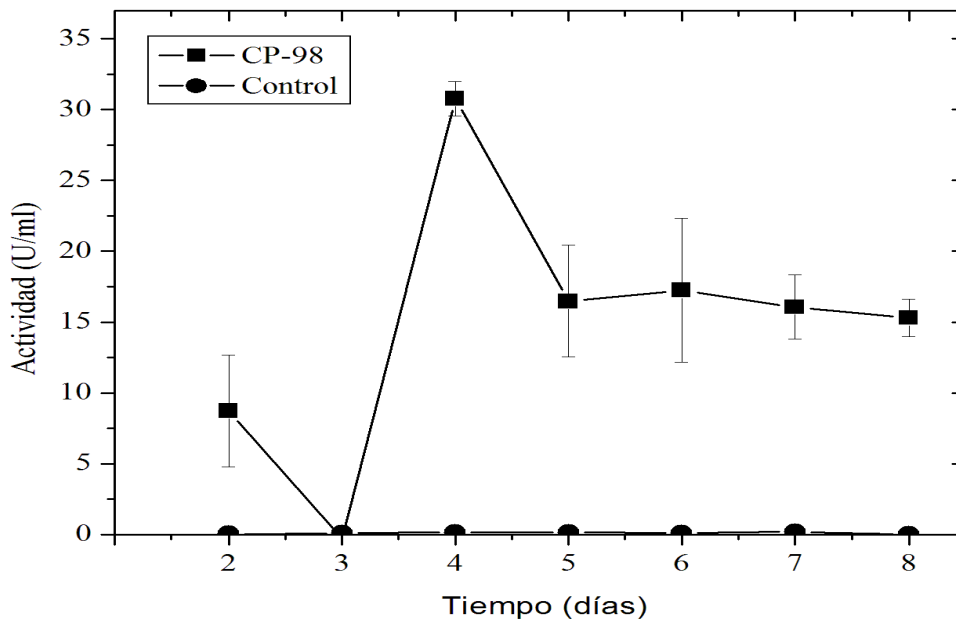


Figura 66. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-98 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMB adiconadeo con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

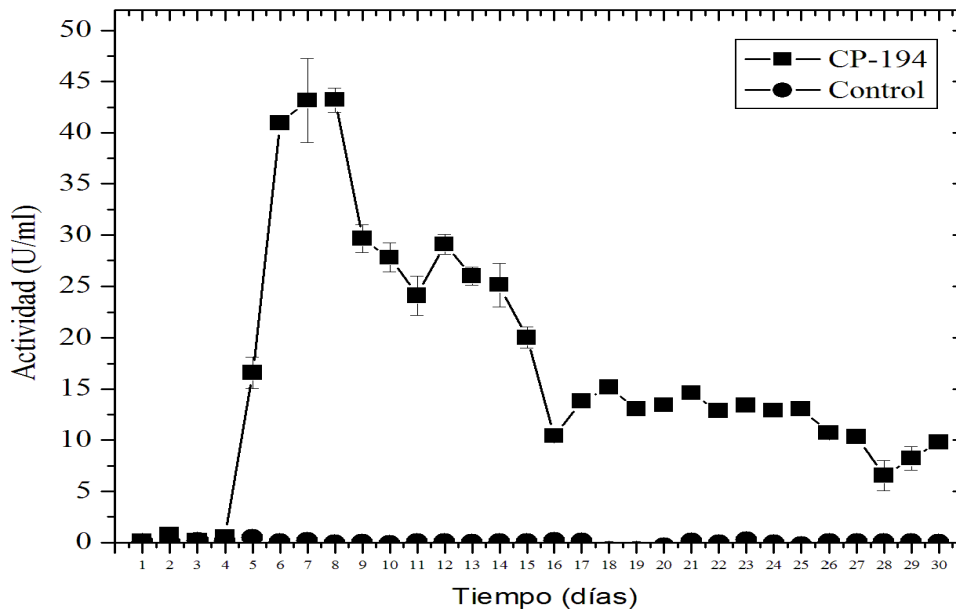


Figura 67. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-194 de *Pleurotus* sp. en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

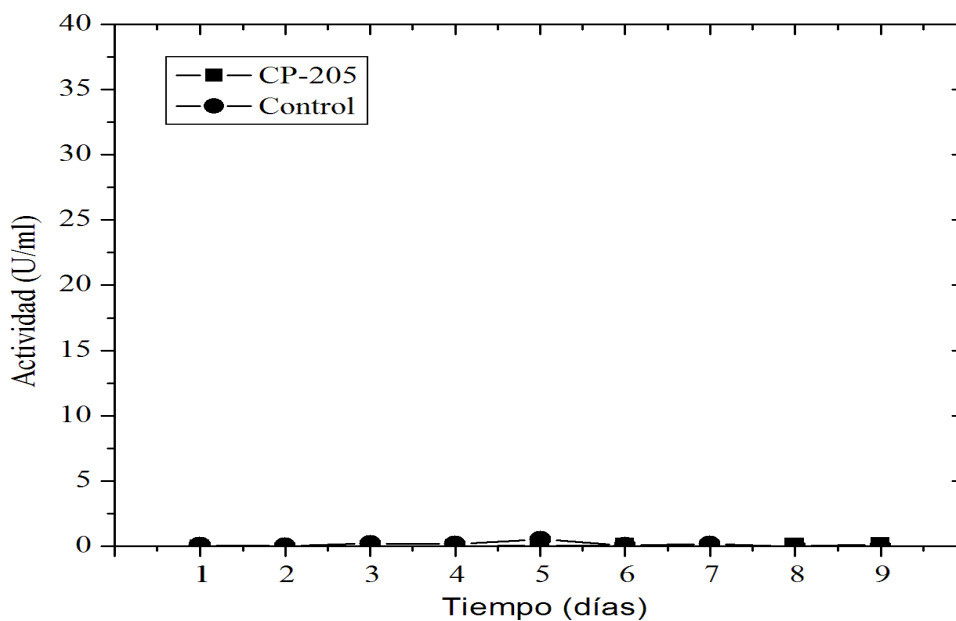


Figura 68. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-205 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

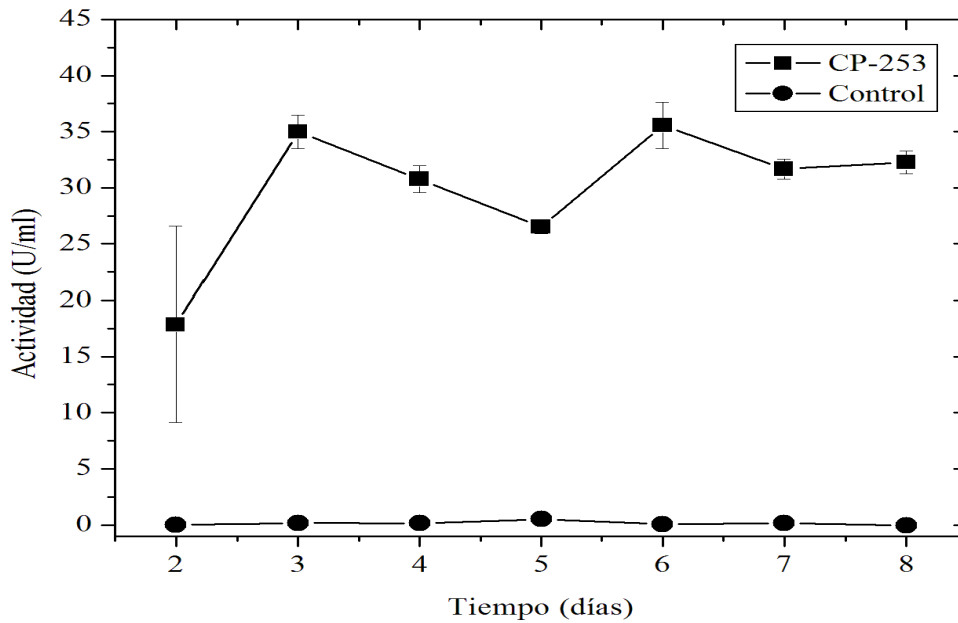


Figura 69. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

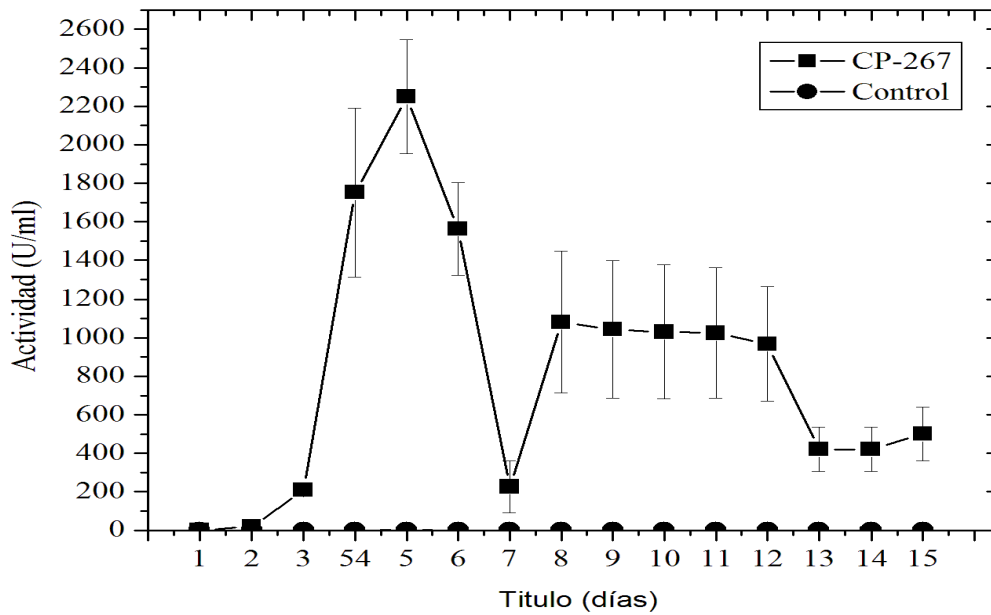


Figura 70. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-267 de *Pleurotus pulmonarius* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

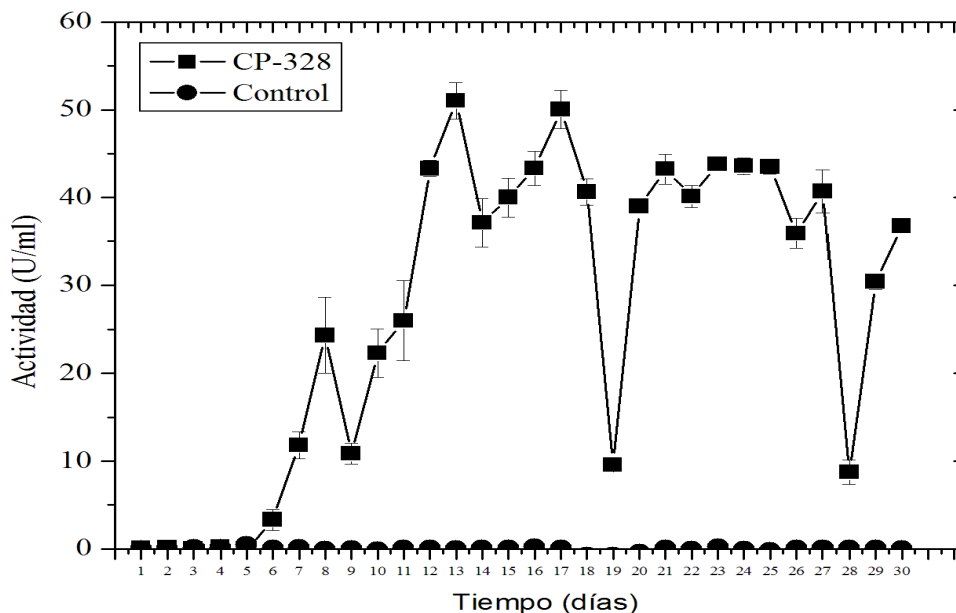


Figura 71. Producción de actividad de lacasas registrada por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarium* en medio de cultivo EMB adicionado con CuSO_4 0.1 mM, comparada con el medio de cultivo en las mismas condiciones, pero sin inóculo (control).

1.5. DISCUSIÓN

El ensayo cualitativo empleado para observar la actividad enzimática resultó ser un método muy práctico para detectar y seleccionar las cepas con el mayor potencial de producción de actividad de lacasas. La eficacia de este método de selección se confirmó al cuantificar la actividad de lacasas en el medio líquido. Es decir, se demostró que existe una evidente concordancia entre la actividad enzimática observada de manera cualitativa y la actividad enzimática medida por el método espectrofotométrico (Cuadro 6). Las pruebas realizadas confirmaron la capacidad de los hongos comestibles para producir enzimas lacasas, como ha sido reportado en la literatura para diversos hongos basidiomicetos, tales como *Phanerochaete chrysosporium*, *Thelephora terrestris*, *Stereum ostrea* o *Lenzites betulina* (Viswanath *et al.*, 2008a). La actividad de las lacasas fue determinada en el sobrenadante del medio de cultivo, ya que la fermentación sumergida es el método mayormente empleado para el análisis enzimático de los hongos (Jhadau *et al.*, 2009; Viswanath *et al.*, 2008b; Unal y Kolankaya, 2001).

Es posible que las cepas que presentaron coloración intensa en la prueba cualitativa, pero no reportaron valores importantes de actividad de lacasas en la prueba cuantitativa, como en el caso de las cepas CP-253 de *Pleurotus djamor* y CP-194 de *Pleurotus* sp. (Cuadro 6), hayan mostrado esa respuesta debido, no solamente a la presencia de enzimas lacasas, sino también al efecto oxidante de otras enzimas presentes, producidas por los hongos, como las manganeso peroxidases o las lignino peroxidases (Pointing, 2001), que no fueron evaluadas en este estudio.

Cuadro 6. Actividad de lacasas de hongos comestibles obtenida por métodos cualitativos y cuantitativos.

CLAVE	ESPECIE	ACTIVIDAD CUALITATIVA	ACTIVIDAD CUANTITATIVA
<i>PLEUROTUS</i>			
CP-18	<i>Pleurotus cystidiosus</i>	-	N.D.
CP-30	<i>Pleurotus levis</i>	+++	1,000 U/ml
CP-50	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+++	4,000 U/ml
CP-98	<i>Pleurotus</i> sp.	+	30 U/ml
CP-194	<i>Pleurotus</i> sp.	+++	40 U/ml
CP-253	<i>Pleurotus djamor</i>	+++	30 U/ml
CP-267	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	+++	2,500 U/ml
CP-328	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	+	50 U/ml
<i>LENTINULA</i>			
CP-5	<i>Lentinula boryana</i>	++	N.D.
CP-7	<i>Lentinula edodes</i>	+	20 U/ml
CP-492	<i>Lentinula boryana</i>	+++	N.D.
<i>GANODERMA</i>			
CP-205	<i>Ganoderma lucidum</i>	+	1 U/ml
CP-389	<i>Ganoderma lucidum</i>	+	N.D.
CP-476	<i>Ganoderma lucidum</i>	+	N.D.
<i>COPRINOPSIS</i>			
CP250	<i>Coprinopsis</i> spp.	++	N.D.

- No presentó, + muy poca coloración, ++ coloración media, +++ mucha coloración, N.D.No determinado.

Las cepas evaluadas en este estudio que sobresalieron por su alta actividad enzimática fueron las del género *Pleurotus* (Figura 72), uno de los géneros de hongos comestibles más estudiados por su actividad de lacasas. En la literatura se encuentran reportados para el género *Pleurotus* valores diversos de actividad de lacasas (Cuadro 7), de cepas que fueron crecidas en diferentes medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos. Específicamente, los dos hongos que mostraron la mayor actividad enzimática en este estudio fueron las cepas CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y CP-267 de *Pleurotus pulmonarius*, con actividades máximas medidas de 4,000 U/ml y 2,500 U/ml respectivamente (Cuadro 7), estas cepas fueron cultivadas en medio EMB adicionado con cobre. La actividad obtenida fue mayor a la reportada en los estudios de Baldrían y Gabriel (2002a y 2002b) en donde se lograron rangos de actividad de lacasas para *Pleurotus ostreatus* entre 0.012 y 0.070 U/ml para el micelio crecido en medio Kirk limitado de nitrógeno, o con adición de cobre al medio, en donde alcanzaron 400 U/ml de actividad (Baldrían y Gabriel 2002a). La actividad enzimática obtenida por la cepa CP-50 fue también superior a la reportada por Hou y colaboradores (2004), de 400 U/ml de actividad para *Pleurotus ostreatus*. Por su parte, Ramírez y colaboradores (2003) obtuvieron una actividad de 20 U/ml a partir de extractos de fermentación sólida de salvado adicionado con vinazas y de 10 U/ml en medio líquido adicionado con 0.25 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ con una cepa de *Pleurotus ostreatus* (Cuadro 7).

Las demás especies del género *Pleurotus* estudiadas, mostraron igualmente una actividad enzimática importante, aunque menor a las de la especie *P. ostreatus*, tal es el caso de las cepas de *P. pulmonarius*, *P. djamor* y *P. sp.* La cepa CP-30 de *P. levis* se diferenció de todas las demás cepas del género *Pleurotus*, debido a que presentó una actividad enzimática muy considerable, a pesar de ser una de las cepas con menor desarrollo micelial, tanto en el medio con agar como en el medio de cultivo líquido. Es posible que el lento crecimiento de esta cepa pueda deberse a que las condiciones de cultivo no sean las óptimas para su desarrollo y actividad, y cabe la

posibilidad de obtener aún mejores resultados por medio de un proceso de optimización de las condiciones de cultivo. A diferencia de la mayoría de las especies de *Pleurotus* evaluadas, la cepa CP-18 de *P. cystidiosus* no mostró actividad de lacasas.

Cuadro 7. Actividad de lacasas de hongos del género *Pleurotus* reportada en la literatura.

REFERENCIA	CONCENTRACIÓN
Ramírez <i>et al.</i> , 2003	20 U/ml
Ramírez <i>et al.</i> , 2003	10 U/ml
Tsioulpas <i>et al.</i> , 2002	Entre los 0.021 y 0.301 U/ml
Baldrían and Gabriel 2002 ^a	Menos a 3 U/ml sin estímulo Hasta aprox. 400 U/ml adicionando Cu
Baldrían and Gabriel 2002 ^b	Entre 0.012 y 0.070 U/ml
Hou <i>et al.</i> , 2004	400 U/ml
Spezzia, 2012	1,000 U/ml (<i>Pleurotus levis</i>)
Spezzia, 2012	4,000 U/ml (<i>Pleurotus ostreatus</i>)
Spezzia, 2012	30 U/ml (<i>Pleurotus</i> sp.)
Spezzia, 2012	40 U/ml (<i>Pleurotus</i> sp.)
Spezzia, 2012	30 U/ml (<i>Pleurotus djamor</i>)
Spezzia, 2012	2,500 U/ml (<i>Pleurotus pulmonarius</i>)
Spezzia, 2012	50 U/ml (<i>Pleurotus pulmonarius</i>)

El género *Ganoderma* es posiblemente uno de los géneros de hongos basidiomicetos menos estudiados por su actividad de lacasas, en este estudio se encontró, tanto en la prueba de preselección en medio de cultivo con agar, como en la evaluación cuantitativa, que no es un género con buena producción de actividad de lacasas. Sin embargo, existen en la literatura reportes de actividad de 338 U/ml para cepas de este género (Asgher *et al.*, 2010) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Actividad de lacasas del género *Ganoderma*.

REFERENCIA	CONCENTRACIÓN	HONGO
Asgher <i>et al.</i> , 2010	338 U/ml	<i>Ganoderma</i> sp.
Murugesan <i>et al.</i> , 2007	2,540 U/g sustrato	<i>Ganoderma lucidum</i>
CEPA DE GANODERMA ESTUDIADA EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN		
Spezzia, 2012	1 U/ml	<i>Ganoderma lucidum</i>

Para el género *Lentinula* también se ha confirmado la capacidad de producir actividad de lacasas con diferentes especies, como en el caso de *L. polychrous* que produce 3.27 U/ml en

medio líquido PDB (Pukahuta *et al.*, 2004). Manjunathan *et al.* (2010) optimizaron un medio para *Lentinula tuberregium* con 2.6 mM de nitrógeno y 250 µM de cobre, obtuvieron una actividad máxima de 29 U/ml, muy similar a la obtenida en este estudio, de 30 U/ml para la cepa CP-7 de *Lentinula edodes* en medio de cultivo EMB. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Actividad de lacasas del género *Lentinula*.

REFERENCIA	CONCENTRACIÓN	HONGO
Pukahuta <i>et al.</i> , 2004	3.27 U/ml	<i>L. polychrous</i> en medio líquido PDB
Manjunathan <i>et al.</i> , 2010	29 U/ml	<i>Lentinula tuberregium</i>
CEPAS DE <i>LENTINULA</i> ESTUDIADAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN		
Spezzia, 2012	30 U/ml	<i>Lentinula edodes</i>

La actividad registrada por las cepas estudiadas, se observó con grandes variaciones entre los diferentes géneros de hongos comestibles, ninguna de las cepas mostró un comportamiento idéntico a otra, la actividad, el tiempo en el que se alcanzó el pico máximo o el número de picos de actividad presentados, fueron específicos para cada cepa. Estas variaciones son indicativas de que no existe un patrón en el comportamiento enzimático entre hongos de un mismo género y mucho menos entre hongos de géneros diferentes. La figura 72 muestra la máxima actividad obtenida para cada una de las cepas estudiadas y el tiempo en el que se obtuvo el pico de mayor actividad. Además, se confirma de esta manera la variabilidad genética que existe entre los hongos comestibles, la cual pudiera tener implicaciones importantes en los procesos de biorremediación, ya que la selección de la cepa adecuada depende de muchos factores, desde las características propias de desarrollo y crecimiento del hongo, hasta la capacidad de producir lacasas, el tipo de lacasas, la cantidad de actividad que presentan y las propiedades de estas lacasas, tales como el tiempo en el que se alcanza el pico máximo de actividad, el período en el que se mantiene activa la enzima, el número de enzimas o isoformas que se producen, entre otros.

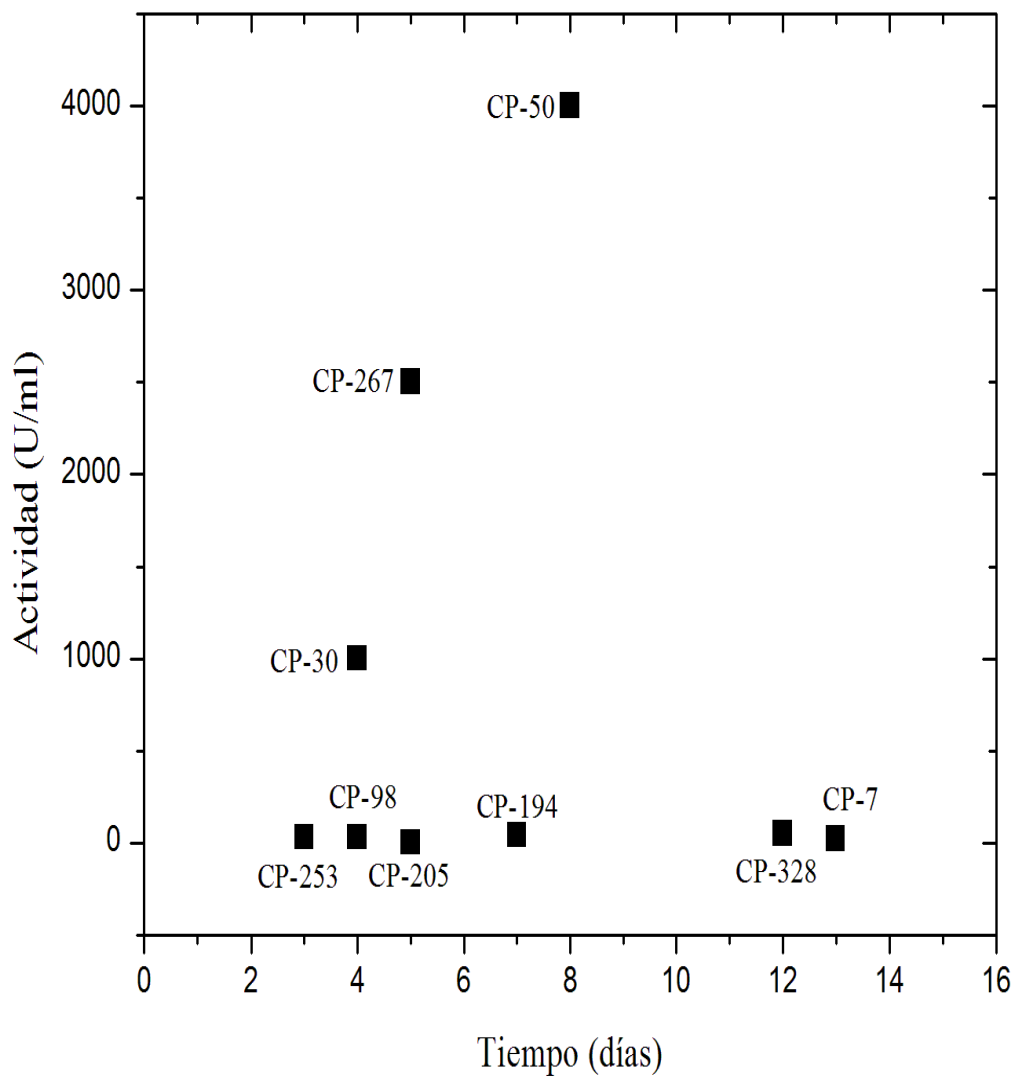


Figura 72. Picos máximos de actividad de lacasas de cepas de hongos comestibles crecidas en medio de cultivo líquido (EMB) a 25°C.

1.6. CONCLUSIONES

El crecimiento micelial y la capacidad de producción de actividad de lacasas es particular para cada una de las cepas de hongos comestibles evaluados. El género *Pleurotus* muestra el mejor efecto de coloración del medio de cultivo con agar y la actividad de lacasas más alta (4,000 U/ml) de las cepas evaluadas, seguidos del género *Lentinula* y por último del género *Ganoderma*. Las cepas de hongos que mostraron mayor actividad de lacasas fueron las cepas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Pleurotus pulmonarius* CP-267, seguido por *Pleurotus levis* CP-30 que a pesar de su lento crecimiento produjo una actividad considerable. De manera general las cepas evaluadas del género *Lentinula* y *Ganoderma* produjeron menor actividad de lacasas comparadas con las cepas evaluadas del género *Pleurotus*. El pH no parece afectar en la expresión de la actividad de lacasas en el medio de cultivo con agar, ya que no ocurrieron cambios importantes de pH durante el desarrollo de los hongos, el crecimiento y la coloración de los medios de cultivo se mantuvieron constantes a pesar de los diferentes sustratos enzimáticos adicionados.

1.7. RECOMENDACIONES

Debido a que los hongos comestibles evaluados en este estudio mostraron tener la capacidad para producir actividad enzimática de lacasas, estas enzimas están involucradas en procesos de degradación de compuestos tóxicos, resulta importante la realización de estudios en donde se confirme la utilidad de estos hongos comestibles y sus lacasas en los procesos de biorremediación, por tal motivo, se recomienda realizar un ensayo para valorar *in vitro* la capacidad de los hongos comestibles para tolerar, crecer y producir lacasas en presencia directa de compuestos tóxicos derivados del petróleo, que permitan la generación de conocimiento sobre el comportamiento de los hongos en condiciones de estrés por contaminantes y el diseño de nuevos métodos de evaluación que optimice la selección de cepas potencialmente útiles en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS DE LA CEPA CP-50 DE *PLEUROTUS OSTREATUS* EN PRESENCIA DE ANTRACENO

2.1. RESUMEN

Los resultados obtenidos en el análisis de la actividad de lacasas, tanto cualitativa como cuantitativamente, demostraron la capacidad de los hongos comestibles para producir actividad enzimática en medios de cultivo en el laboratorio. Estos ensayos permitieron la selección de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* como la mejor cepa productora de actividad de lacasas en las condiciones estudiadas. Por lo tanto, la cepa CP-50 fue utilizada en las siguientes pruebas, en donde se estudió la capacidad de este hongo para crecer y producir actividad enzimática de lacasas en presencia de un hidrocarburo aromático policíclico del petróleo (antraceno). Se diseñó y evaluó un método de estudio sencillo y eficiente, empleando medio de cultivo con agar y creciendo el micelio en contacto directo con altas concentraciones de antraceno. El análisis se realizó en 3 tiempos. Durante el desarrollo micelial, la actividad de lacasas se midió con la oxidación de cuatro sustratos distintos: ácido 2, 2' Azinobis-3-etil- benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS, Sigma) 2,6-dimetoxifenol (DMP), guayacol y syringaldazina. El área micelial se calculó con ayuda del programa progeCAD 2009 Smart y la concentración de proteínas presentes se obtuvo por el método de Bradford. Los resultados de estos ensayos mostraron que la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* fue capaz de crecer en presencia y sobre antraceno en polvo. Se demostró además una estimulación en el crecimiento micelial y en la producción de actividad de lacasas en presencia del contaminante en la misma placa petri.

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos, hongos comestibles, lacasas.

2.2. OBJETIVOS

- Establecer un método práctico para evaluar la tolerancia y capacidad de producción enzimática de hongos comestibles sobre compuestos tóxicos en polvo.
- Evaluar la tolerancia de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* para crecer en presencia de antraceno.
- Evaluar la actividad de lacasas de la cepa CP-50 durante su cinética de crecimiento en presencia de antraceno.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Tolerancia de *Pleurotus ostreatus* para crecer en presencia de antraceno

La tolerancia de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* para crecer en presencia de antraceno se evaluó en dos etapas:

Primera etapa: Desarrollo micelial de hongos comestibles en medio de cultivo EMA (30 g/L, Bioxon) con antraceno estéril y no estéril en una concentración de 0.05 g/L.

Se preparó y esterilizó el medio EMA (30 g/L, Bioxon), como lo indica el fabricante, en tubos de ensayo de vidrio de 100 ml (25 ml en cada tubo). Se vertió el medio caliente de cada tubo en cada una de las placas petri de 9 cm de diámetro y se dejó gelificar. La placa se dividió y marcó por el reverso en dos partes iguales. En una de las mitades de la placa Petri se adicionó el antraceno en polvo (0.00125 g por placa = 0.05 g/L). El antraceno se colocó en dos variantes: estéril (esterilizado dentro de sobres de papel a 15 Lbs, 20 min) y no estéril. La aplicación se realizó tapando la otra mitad con papel celofán estéril, para delimitar el área contaminada. Con popotes estériles de 5 mm de diámetro, se perforó el medio colonizado con micelio de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida previamente en medio EMA durante 8 días, con una aguja estéril se recuperó el círculo de agar con micelio y se inoculó a 2 cm de distancia del centro de la placa en la mitad sin antraceno. Las placas inoculadas y los controles se incubaron a temperatura ambiente (20°-26°C) durante 5 semanas.

Segunda etapa: Desarrollo micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMA adicionado con antraceno estéril y no estéril en diferentes concentraciones.

Dado que se comprobó que *Pleurotus ostreatus* toleró satisfactoriamente la dosis de 0.05 g/L de antraceno, sin mostrar diferencias importantes entre los tratamientos y los controles, en la segunda etapa se probaron dosis mayores de antraceno: 0.4 g/L y 4 g/L (0.01 g y 0.1 g por placa respectivamente), la preparación del medio y el desarrollo del experimento se llevaron a cabo como se describe en la primer etapa.

2.3.2. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno

A partir del estudio anterior, en donde se comprobó la tolerancia de *Pleurotus ostreatus* para crecer en presencia de antraceno, se planteó un diseño experimental para la evaluación de la actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia de este compuesto tóxico, el método desarrollado se describe a continuación:

Preparación del inóculo. Se perforó con popotes estériles de 5 mm de diámetro el micelio de la cepa CP-50 crecida previamente en medio EMA (30 g/L, Bioxon) durante 8 días, con una aguja estéril se recuperó el círculo de agar y micelio. El círculo se inoculó en una nueva placa con medio EMA (30 g/L, Bioxon) para la evaluación de la actividad de lacasas.

Inoculación y crecimiento de la cepa CP-50. Se preparó y esterilizó medio EMA (30 g/L, Bioxon) en tubos de ensayo de vidrio de 100 ml (25 ml de medio en cada tubo). Se vertió el medio de cada tubo en una de las placas petri de 9 cm de diámetro y se dejó gelificar. Las placas se dividieron y marcaron por el reverso en dos partes iguales. Simultáneamente se preparó medio de cultivo EMA (30 g/L, Bioxon), adicionado con ABTS 0.5 mM. La prueba se hizo por triplicado para los medios de cultivo sin ABTS y por duplicado para los medios de cultivo adicionados con ABTS. Se agregó 0.1 g de antraceno estéril en la mitad de cada una de las placas, tapando la otra mitad con papel celofán estéril, para evitar contaminar el área (Figura 73). Se retiró el papel celofán y se inoculó el círculo de agar con micelio crecido, al centro de la mitad de la placa sin antraceno (a 2 cm del centro de la placa). Todo el procedimiento se realizó en el mismo día.

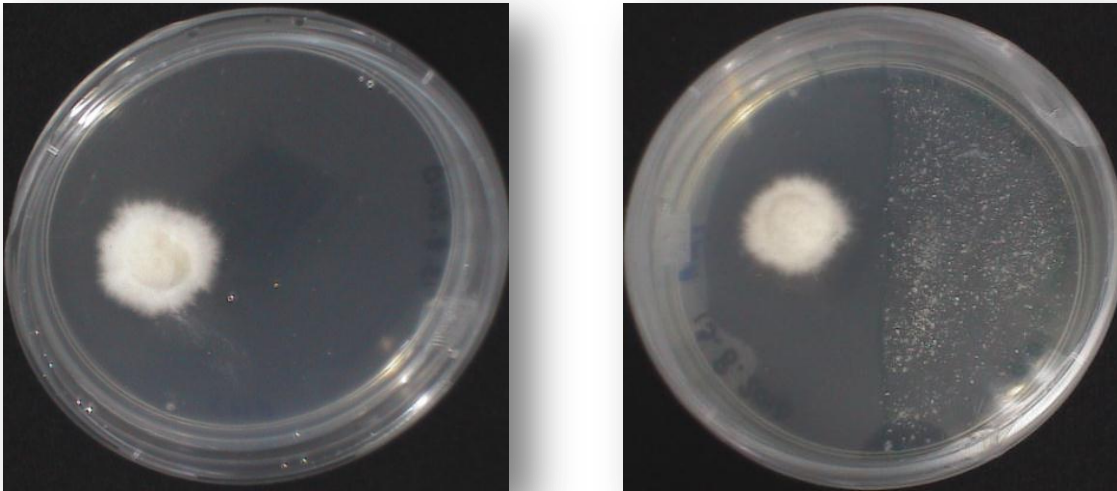


Figura 73. *Pleurotus ostreatus* CP-50 a los 3 días de crecimiento en medio de cultivo EMA. A: Control (sin la adición de antraceno). B: Tratamiento (con la adición de 0.1 g de antraceno).

Parámetros a evaluar. Se analizó el área micelial, la actividad de lacasas y la producción de proteínas en tres tiempos durante el desarrollo del micelio en el medio de cultivo EMA. Para cada tiempo de evaluación se analizaron 5 placas de tratamiento, 5 placas de control positivo y 5 placas de control negativo. Los controles empleados fueron:

- Control positivo, la placa con hongo sin antraceno.
- Control negativo, la placa sin hongo, solo con antraceno.

Los parámetros evaluados fueron:

- Observaciones morfológicas.
- Actividad de lacasas (U/ml).
- Área de crecimiento micelial (cm²).
- Concentración de proteína (mg/ml).

Obtención de muestra. Se utilizó un cuadro de lámina de acero inoxidable con un área interior de 12 cm² para obtener el medio con agar cubierto de micelio crecido (Figura 74). El

fragmento obtenido se trasladó con una espátula estéril, a un tubo falcon de 50 ml y se agregaron 4 ml de buffer de acetato de sodio (J. T. Baker) 1 M, pH 5, preparado fresco y ajustado con ácido acético glacial (J. T. Baker) 1 M. Las muestras que se tomaron para cada tiempo son las descritas en el Cuadro 10. El tubo se agitó en vórtex durante 8 minutos a la velocidad máxima para homogeneizar el contenido y se centrifugó a 13,200 rpm durante 5 minutos (Eppendorf). Se recuperó el sobrenadante y se trasladó a un tubo falcon de 15 ml. La muestra se guardó en congelación (REVCO ULT1340-3-A30) a -20° C hasta su uso.

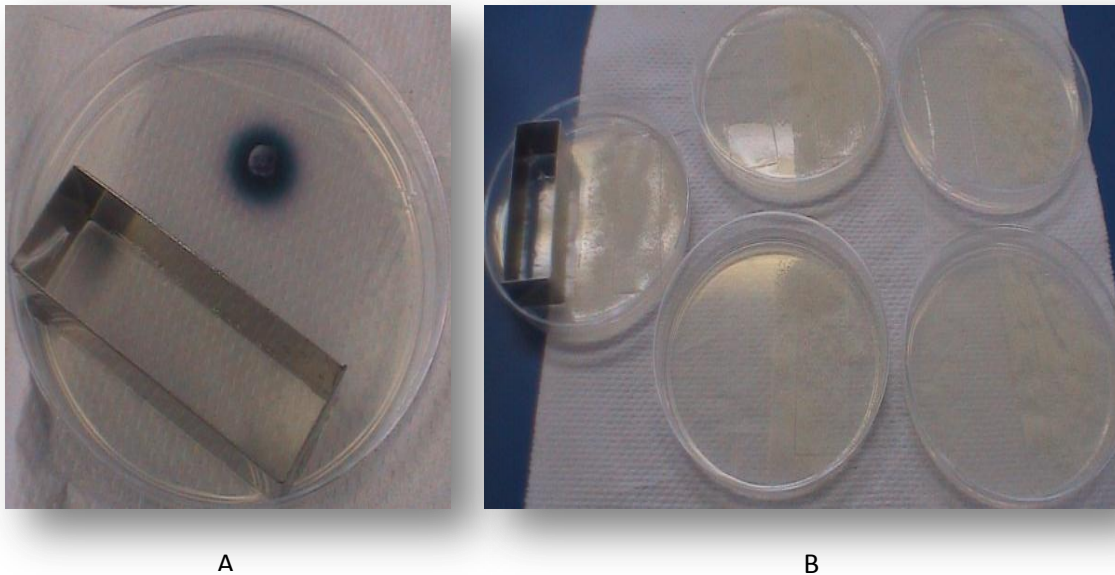


Figura 74. Obtención de muestra en Tiempo 0 (0 a 24 horas de crecimiento), para evaluar actividad de lacasas. A: CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo EMA sin antraceno y con ABTS. B: Control negativo en medio EMA adicionado con antraceno.

Cuadro 10. Muestras tomadas para la evaluación de lacasas en diferentes tiempos.

Tiempo	Control positivo		Tratamiento			Control negativo	
Tiempo cero (0-24 horas)	¹ Agar	² Micelio	Antraceno	Micelio		Agar	⁴ Antraceno
Tiempo 1. Micelio en presencia, no contacto de antraceno (8 días)	Agar	Micelio	Antraceno	Micelio		Agar	Antraceno
Tiempo 2. En contacto directo con antraceno* (16 días)	Agar	Micelio	Antraceno	³ Micelio sobrecrecido	Micelio	Agar	Antraceno
Tiempo 3. Sobrecrecido en antraceno* (24 días)	Agar	Micelio		Micelio sobrecrecido		Agar	Antraceno

*Las placas que fueron adicionadas con ABTS, mostraron un crecimiento más lento, por lo tanto se tomó la muestra del tiempo 2 como micelio y la del tiempo 3 como contacto.

¹ La muestra se tomo de medio de cultivo sin micelio.

² La muestra se tomó de micelio con medio de cultivo.

³ La muestra se tomó de micelio que ha crecido sobre el antraceno.

⁴ La muestra se tomo de medio de cultivo con antraceno.

Determinación de la actividad de lacasas. El sistema de medición de la actividad de las lacasas se realizó como se describió en el apartado 1.3.2. “Evaluación de la producción de la actividad de lacasas”. Sin embargo, los sustratos enzimáticos utilizados en esta evaluación fueron: ABTS, como se describe en el apartado mencionado. DMP (Concentración 6 mM, diluido en etanol, longitud de onda de lectura 468 nm, coeficiente de extinción 27,500). Guayacol (Concentración 60 mM, diluido en etanol, longitud de onda de lectura 470 nm,

coeficiente de extinción 26,600). Y Siringaldazyna (Concentración 0.1 mM diluido en metanol, longitud de onda de lectura 520 nm, coeficiente de extinción: 65,000).

Actividad de lacasas en distintas zonas de una misma colonia. Con la finalidad de comparar la producción de la actividad de lacasas en diferentes partes de una misma colonia de hongo, expuesta a antraceno, se tomaron muestras de micelio y medio de cultivo en diferentes partes de la misma y en diferentes momentos del crecimiento micelial. La primera muestra fue tomada durante el tiempo 2, es decir, con 8 días de crecimiento y consistió de micelio en contacto directo con el antraceno (tratamiento) y micelio en el lado opuesto al antraceno (control). La segunda muestra fue tomada en el tiempo 3, es decir, con 15 días de crecimiento y consistió en el micelio sobrecrecido en antraceno (tratamiento) y el micelio en el lado opuesto al antraceno (control). Cada muestra fue extraída con un cuadro de lámina de acero inoxidable estéril, como se describe anteriormente.

2.3.3. Área de crecimiento micelia

El área micelial se calculó con la ayuda del programa progeCAD 2009 Smart. Se tomaron fotografías de cada una de las placas Petri colonizadas con el micelio del hongo en cada uno de los tiempos mencionados en el Cuadro 10. Se delineó el contorno del micelio y se calculó el perímetro y área de cada imagen con las funciones del programa.

2.3.4. Concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por medio del Kit de Biorad (Biorad, USA), el cual se basa en el método de Bradford (1976), que consiste en elaborar una curva de calibración con una cantidad conocida de proteína. Las diluciones se realizaron con una solución estándar de proteína BSA (Sigma) con una concentración final de 1 a 20 microgramos/ml (incluyendo el colorante) como se muestra en el Cuadro 11. Se midió la absorbancia a 595 nm. Se mezclaron y agitaron 160 μ l de cada muestra con 40 μ l de la solución colorante en un tubo eppendorf y se dejó incubar durante 30 minutos. Se midió la absorbancia de cada muestra a 595 nm (Biotek) y se calculó la concentración a través de la curva de calibración.

Cuadro 11. Concentración de reactivos necesarios para elaborar la curva de calibración de proteínas.

	Concentración BSA ($\mu\text{g/ml}$)				
	3	6	9	12	15
Colorante	40 μl	40 μl	40 μl	40 μl	40 μl
Solución estándar BSA (100 $\mu\text{g/ml}$)	6 μl	12 μl	18 μl	24 μl	30 μl
Agua destilada	154 μl	148 μl	142 μl	136 μl	130 μl
Volumen total	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl

Análisis estadísticos. El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Tolerancia de la cepa para crecer en presencia de antraceno

Pleurotus ostreatus en presencia de 0.00125 g/placa Petri de antraceno mostró un crecimiento normal en comparación al control, sin ningún tipo de inhibición (Figura 75), sino al contrario, observándose un efecto estimulante en la colonia.

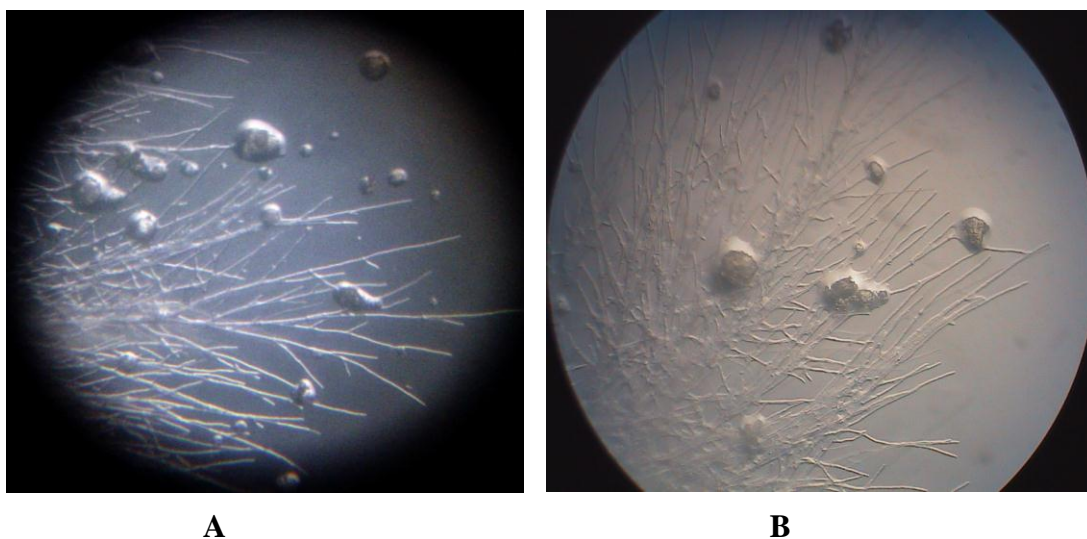


Figura 75. A: Observación microscópica de hifas creciendo en presencia de antraceno. B: CP-50 creciendo sobre fragmentos de antraceno. Aumento 40 X.

En las pruebas subsecuentes se sometió al hongo a crecer en presencia de cantidades mayores de antraceno (0.01 y 0.1 g por placa petri) se observó igualmente un desarrollo similar al control, con una estimulación del crecimiento micelial. La estimulación se presentó después del tercer día de incubación, cuando el micelio se encontraba cercano al antraceno, aún sin contactarlo, alcanzando para el día 10 de crecimiento una diferencia importante en comparación al control, específicamente en las placas que contenían 0.1 g de antraceno (la concentración mayor), éstas mostraron un diámetro micelial 25% mayor que el del control. De igual manera, las placas que contenían antraceno estéril como las que contenían antraceno sin esterilizar (Figura 76). Estos resultados permitieron seleccionar la dosis más alta (0.1 g/placa = 4 g/L de antraceno), para la evaluación de la actividad de lacasas, de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno.

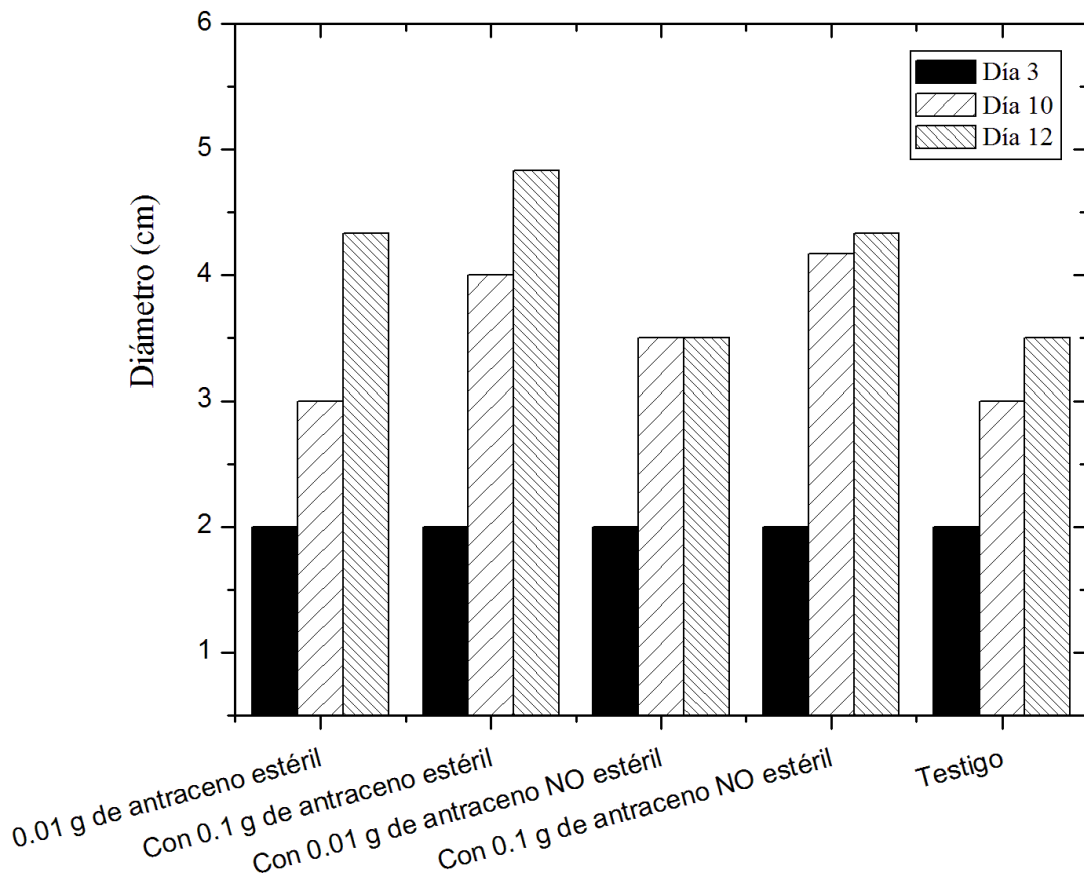


Figura 76. Crecimiento micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno a diferentes concentraciones sobre medio EMA.

2.4.2. Observaciones morfológicas

Los resultados obtenidos de las pruebas de tolerancia y las observaciones realizadas durante el crecimiento de CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno, permitieron confirmar la existencia de un estímulo en el crecimiento micelial cuando estuvo presente el antraceno. Observándose la producción de hifas especialmente dirigidas hacia la zona del antraceno, otorgándole a ésta una forma irregular. Sin embargo, cuando el micelio entró en contacto directo con el antraceno, se observó un breve efecto inhibitorio del crecimiento del micelio, para después sobrecrecer en el compuesto. Posiblemente debido a una etapa de adaptación, para posteriormente crecer abundantemente, en muchos de los casos la cepa se desarrolló más en los tratamientos que en los controles (Figura 77).

Cuando se adicionó ABTS a los medios de cultivo, se presentó una inhibición en el crecimiento, debido a la interferencia de este compuesto sobre el desarrollo del hongo, dando al micelio contorno circular y un tono más rosado en la parte central de la colonia. Este efecto fue aún más evidente en las placas con antraceno, posiblemente debido al doble estrés al que se sometieron. Sin embargo, al final del tiempo de incubación se observó que el halo de coloración producido por la oxidación del sustrato, en el caso de los tratamientos, alcanzó a llenar toda la placa, a diferencia del halo de color presentado por los controles, en donde se observó, para todas las replicas, una coloración con un halo que ocupó solamente tres cuartas partes de la placa (Figuras 78 y 79).

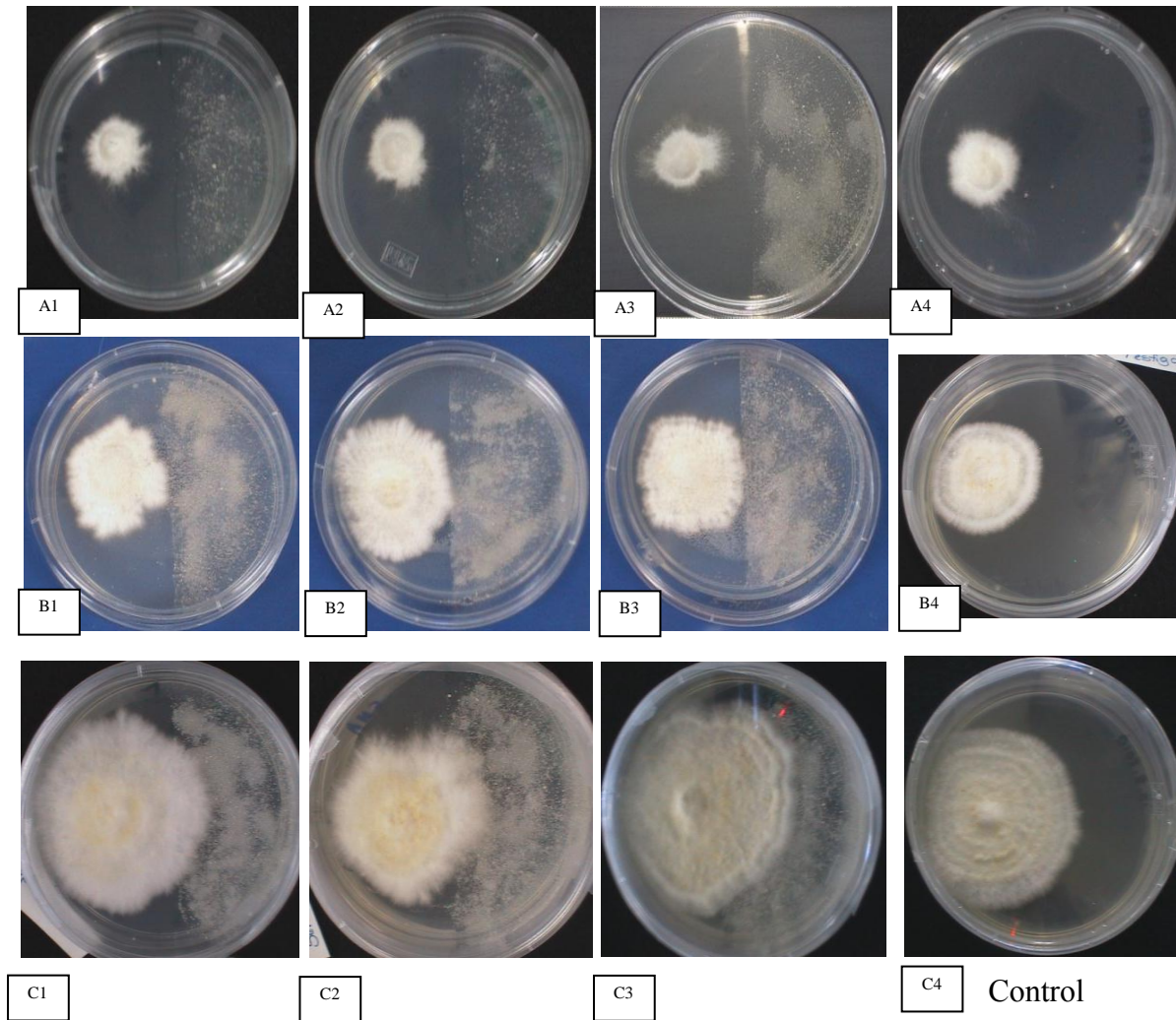
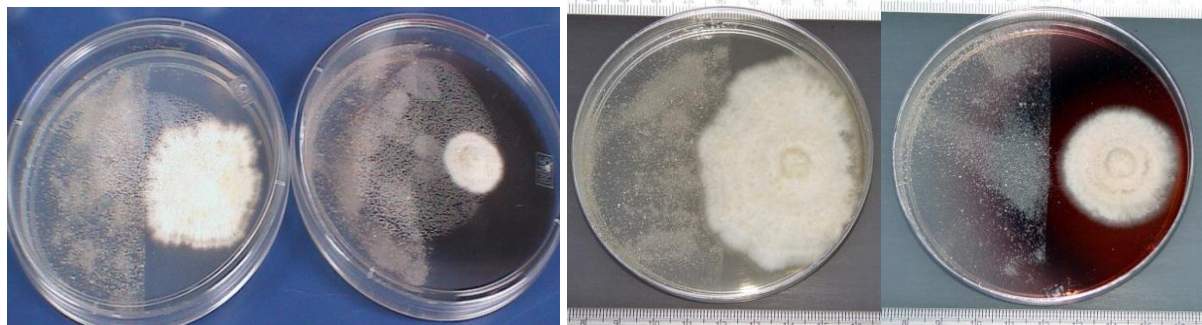


Figura 77. Diferentes etapas del crecimiento de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* sobre antraceno. A1-A3) Se muestra el crecimiento de la cepa CP-50 en presencia de antraceno a los 3 días de crecimiento, en donde se aprecia el estímulo del compuesto sobre el desarrollo de las hifas, en comparación al control (A4). B1-B4) La cepa CP-50 alcanzó el borde del antraceno a los 8 días de crecimiento y se notó una delimitación muy clara entre ambos. C1-C3) CP-50 sobrecreciendo el antraceno a los 15 días de crecimiento y mostrando micelio de mejor apariencia que el control (C4).



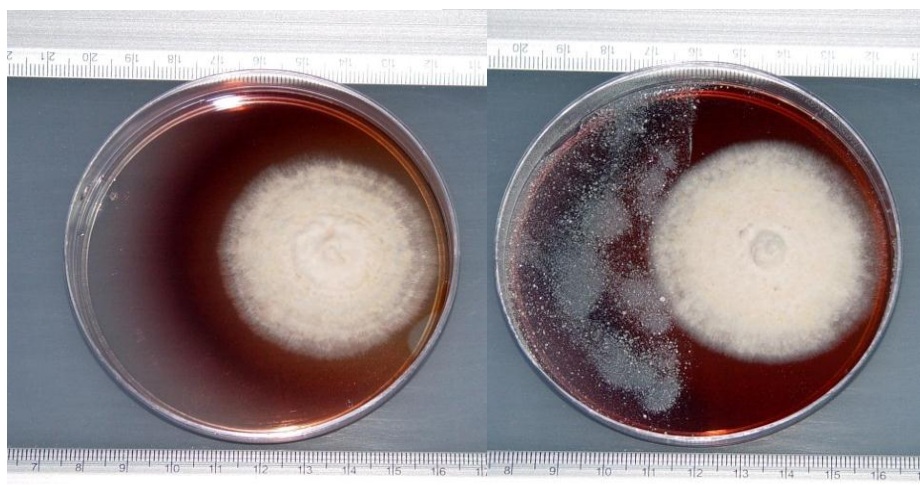
A-1

A-2

B-1

B-2

Figura 78. CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio EMA adicionado con 0.1 g de antraceno. A-1: medio sin ABTS, a los 8 días de crecimiento. A-2: medio con ABTS 0.5 mM, a los 8 días de crecimiento; B-1: Medio sin ABTS a los 15 días de crecimiento; B-2: medio con ABTS 0.5 mM, a los 15 días de crecimiento.



A

B

Figura 79. Cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* creciendo en medio EMA adicionado con ABTS 0.5 mM. A: en ausencia de antraceno. B: en presencia de 0.1 g de antraceno a los 15 días de crecimiento.

2.4.3. Actividad de lacasas

La cepa CP-50, mostró con tres de los cuatro sustratos enzimáticos evaluados (ABTS, guayacol y syringaldazina) que la mayor actividad de lacasas se presentó a los 3 días de crecimiento. En este tiempo, la cepa CP-50 reportó la mayor actividad con el sustrato syringaldazina (28.06 U/ml) y la menor con guayacol (1.39 U/ml). El tiempo 1 (3 días de crecimiento) representó el tiempo en el que la cepa creció aproximadamente 1.5 cm de radio, por lo que se encontraba en presencia del antraceno, pero aún sin contactarlo directamente.

Los controles presentaron, con tres de los cuatro sustratos enzimáticos evaluados (DMP, guayacol y syringaldazina) el pico máximo de actividad fue en el tiempo 2 (8 días de crecimiento). La actividad de lacasas evaluada con el sustrato enzimático syringaldazina alcanzó 25.21 U/ml de actividad y con DMP 26.9 U/ml (Cuadros 12-15 y Figuras 82-85).

Cuadro 12. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato ABTS.

CINÉTICA	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0	0.03	0.58	0.05
T1 (3 días)	11.68	3.23	10.08	1.61
T2 (8 días)	3.56	0.74	3.02	0.67
T3 (15 días)	10.02	5.81	10.89	1.89

Cuadro 13. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato DMP.

CINÉTICA	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0.06	0.02	0.88	0.07
T1 (3 días)	27.84	8.23	17.71	5.46
T2 (8 días)	22.07	4.37	26.90	4.20
T3 (15 días)	29.94	2.66	28.32	20.31

Cuadro 14. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato guayacol.

CINÉTICA	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0	0.04	0.22	0.21
T1 (3 días)	1.40	0.34	0.67	0.51
T2 (8 días)	1.26	0.13	0.72	0.39
T3 (15 días)	1.08	0.19	0.32	0.16

Cuadro 15. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 evaluada con el sustrato syringaldazina.

CINÉTICA	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0.30	0.10	1.29	0.17
T1 (3 días)	28.06	5.03	15.89	8.61
T2 (8 días)	25.21	3.60	25.21	3.60
T3 (15 días)	20.15	1.33	15.05	1.06

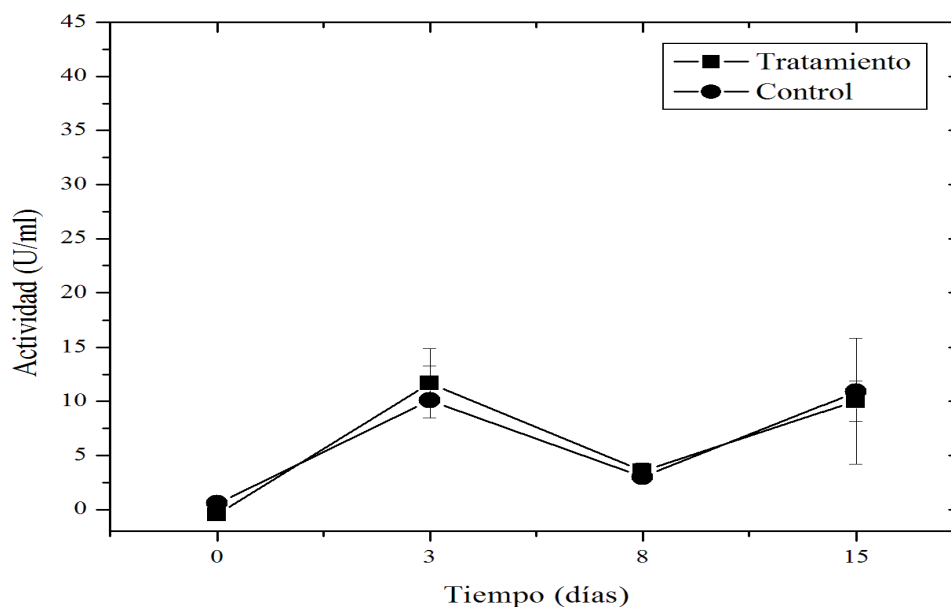


Figura 80. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno y evaluada con ABTS.

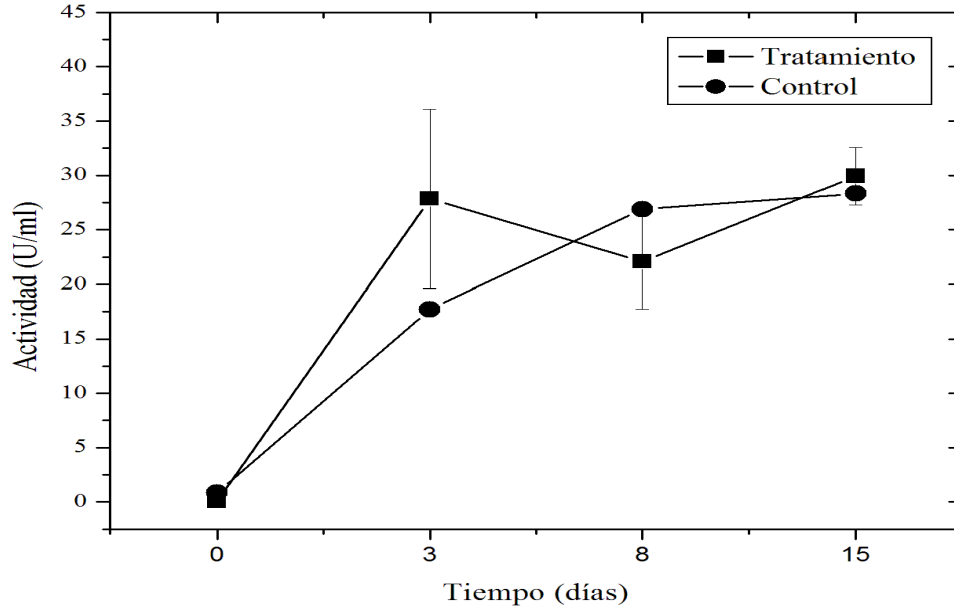


Figura 81. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno y evaluada con DMP.

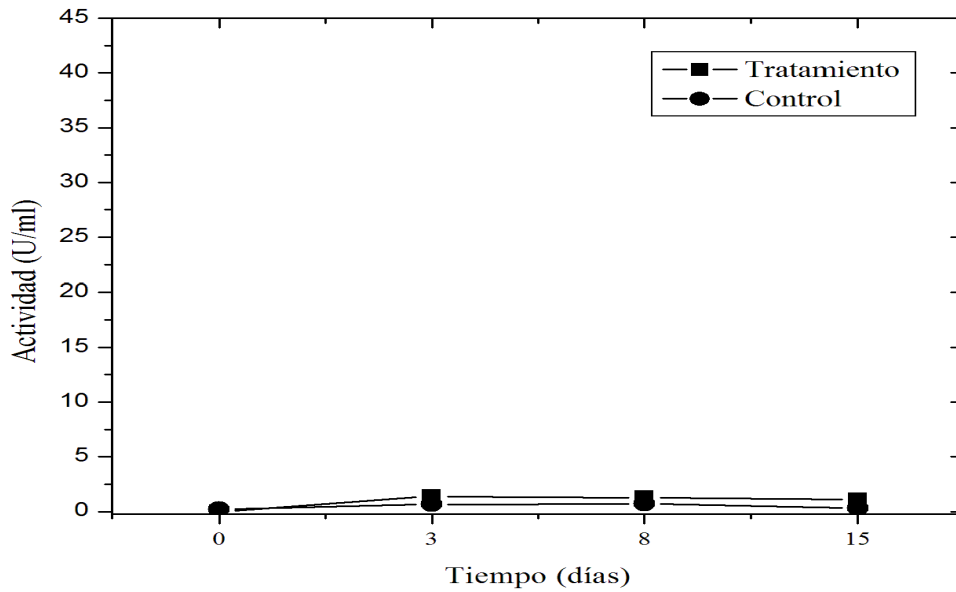


Figura 82. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno y evaluada con guayacol.

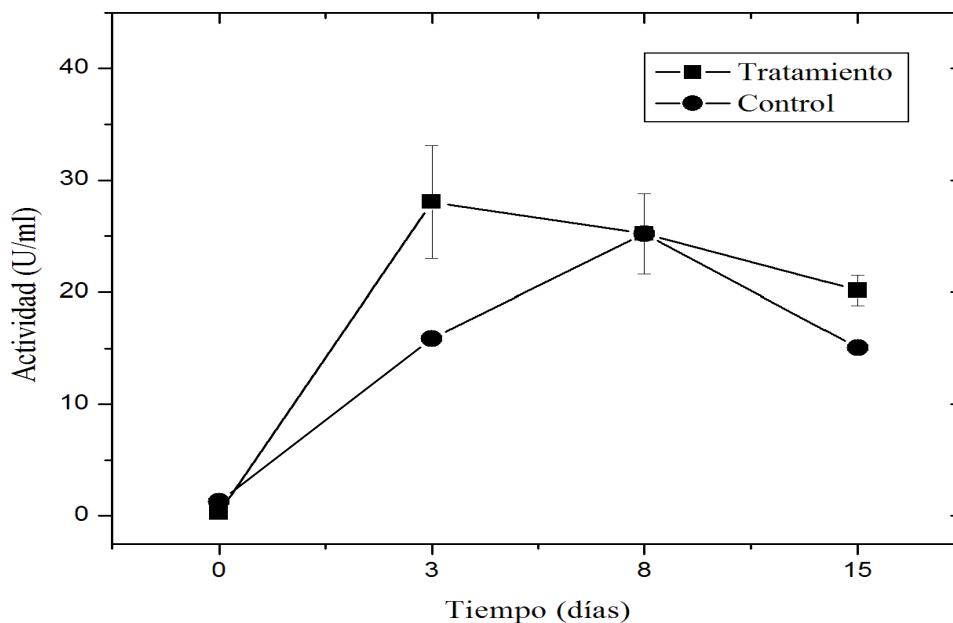


Figura 83. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno y evaluada con syringaldazina.

La actividad de lacasas obtenida por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* fue distinta en el medio sin ABTS (Cuadros 12-15, Figuras 80-83), que en el medio adicionado con ABTS (Cuadros 16-19, Figuras 84-87). Como se mencionó anteriormente, el crecimiento micelial en el medio adicionado con ABTS fue más lento y de igual manera, el pico máximo de actividad no se alcanzó en el tiempo 1 (3 días de crecimiento, como en las placas sin ABTS) sino hasta el tiempo 2 (8 días de crecimiento) como se muestra en las Figuras 84-87. Con el sustrato DMP se registraron valores de actividad de lacasas mucho más altos cuando se encontró presente el sustrato ABTS en el medio, que cuando no se encontró. El sustrato guayacol tuvo una sensibilidad muy baja a la oxidación por las lacasas, al igual que en las pruebas con el medio de cultivo sin ABTS. En cambio el sustrato Syringaldazina reaccionó con el ABTS ya oxidado del medio de cultivo, de manera que los valores obtenidos por espectroscopía se redujeron en lugar de oxidarse y por lo tanto los resultados de absorbancia obtenidos con este sustrato enzimático fueron menores a los esperados.

Cuadro 16. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* evaluada con el sustrato enzimático ABTS en medio de cultivo adicionado con ABTS.

	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0.03	0.10	0.00	0.60
T1 (3 días)	5.23	3.85	8.96	0.16
T2 (8 días)	4.57	0.73	4.82	1.73
T3 (15 días)	16.58	0.88	18.21	1.40

Cuadro 17. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* evaluada con el sustrato enzimático DMP en medio de cultivo adicionado con ABTS.

	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0	0.09	0.28	0.49
T1 (3 días)	27.63	11.78	8.72	5.10
T2 (8 días)	40.20	0.77	32.03	6.91
T3 (15 días)	18.11	6.50	44.92	11.35

Cuadro 18. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* evaluada con el sustrato enzimático guayacol en medio de cultivo adicionado con ABTS.

	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0	0.09	0	0.08
T1 (3 días)	0.90	0.16	0.29	0.20
T2 (8 días)	1.20	0.06	1.11	0.23
T3 (15 días)	1.24	0.04	4.11	1.75

Cuadro 19. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* evaluada con el sustrato enzimático syringaldazina en medio de cultivo adicionado con ABTS.

	TRATAMIENTO		CONTROL	
	Media (U/ml)	Error estandar	Media (U/ml)	Error estandar
T0 (4 h)	0	0.15	0	1.41
T1 (3 días)	8.48	6.60	4.88	8.51
T2 (8 días)	30.63	0.03	20.57	3.02
T3 (15 días)	19.57	1.05	16.74	1.13

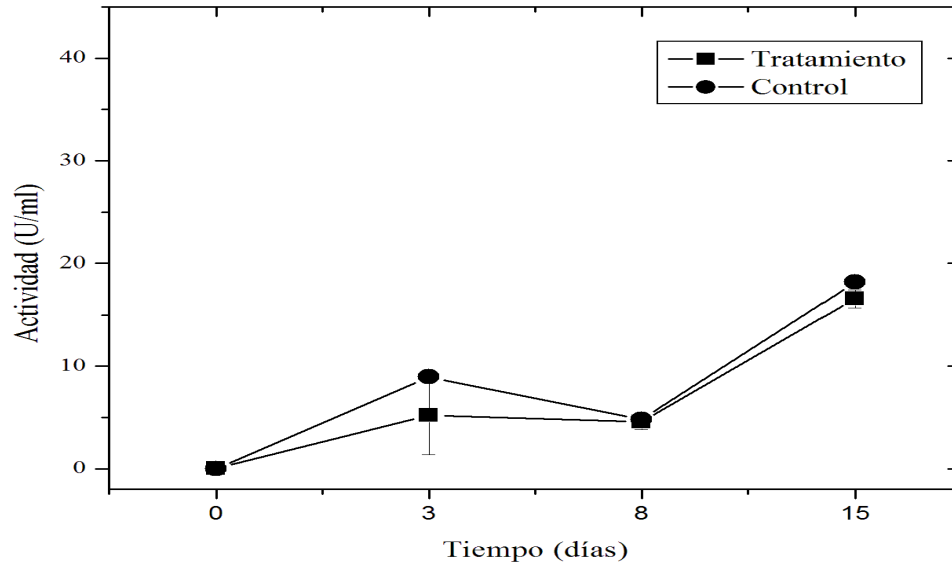


Figura 84. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con ABTS.

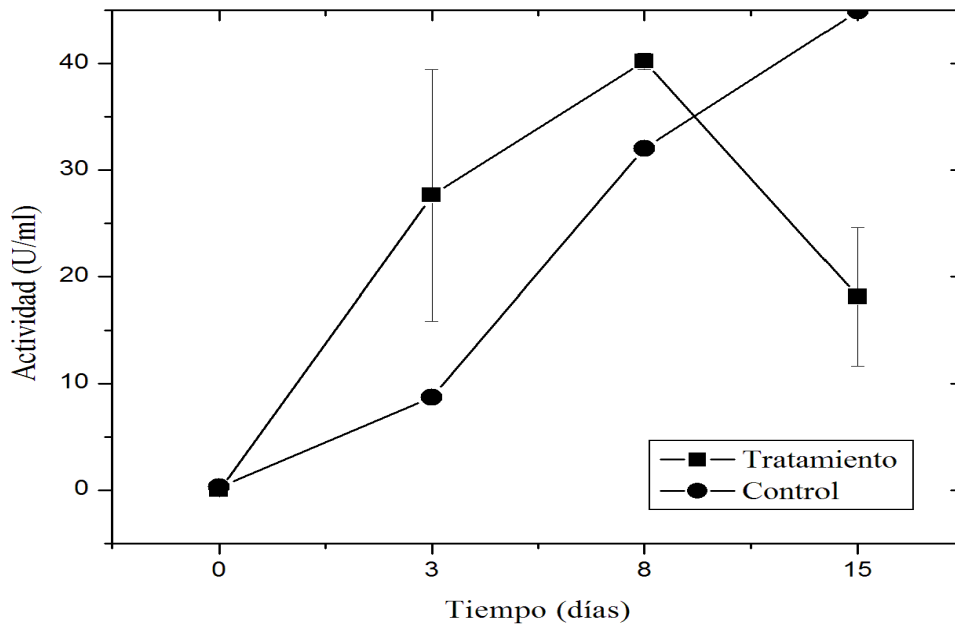


Figura 85. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con DMP.

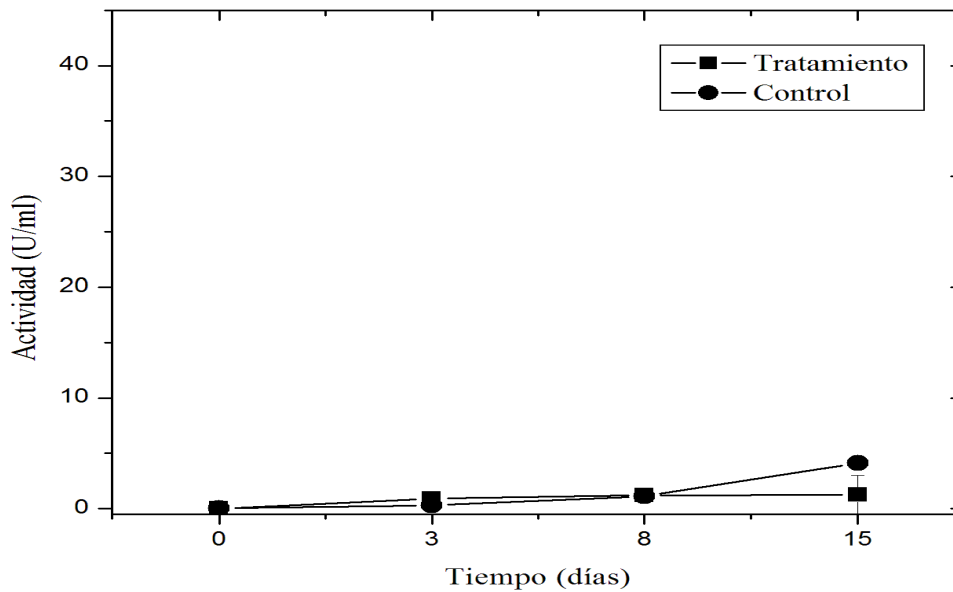


Figura 86. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con guayacol.

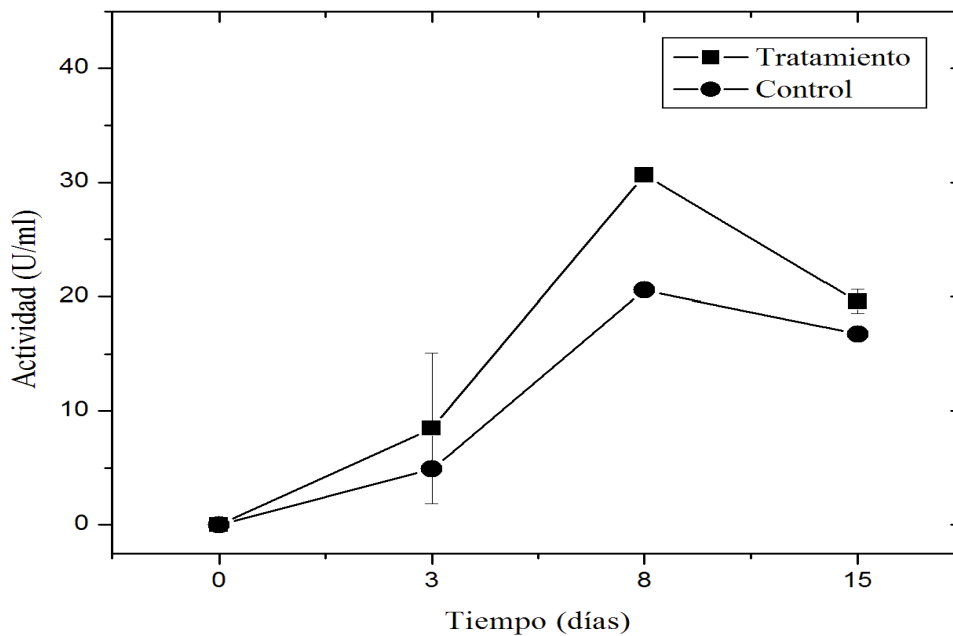


Figura 87. Actividad de lacasas de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en medio EMA adicionado con ABTS, en presencia de antraceno y evaluada con syringaldazina.

La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* demostró tener la capacidad para desarrollarse de manera normal aún en presencia de concentraciones muy altas de antraceno, ya que la actividad de lacasas reportada fue similar y estadísticamente sin diferencia significativa (Análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con cuatro repeticiones y alfa = 0.05) entre los controles y los tratamientos (ANEXO III).

Además, pudo notarse un incremento en la producción de la actividad de lacasas al momento del crecimiento micelial cerca y sobre el antraceno, y una ligera disminución de la actividad de lacasas en el momento del primer contacto entre el micelio y el antraceno, en comparación con los controles.

Actividad de lacasas en distintas zonas de una misma colonia. Los resultados obtenidos en el análisis de la actividad de lacasas durante el tiempo 2 (8 días de crecimiento en medio EMA adicionado con antraceno) mostraron una actividad ligeramente menor en el punto de contacto, en comparación al punto opuesto. Sin embargo, durante el tiempo 3 (15 días de crecimiento) la actividad de lacasas fue ligeramente superior en la zona de sobrecrecimiento que en la zona opuesta, lo que confirmó un proceso de disminución temporal de actividad en presencia de antraceno, en el momento de contacto y un estímulo después de este momento (Cuadros 20-21 y Figuras 88-89).

Cuadro 20. Actividad de lacasas observada en dos zonas distintas de una colonia de *Pleurotus ostreatus* en el momento del contacto con el antraceno, medio EMA, 20°-26°C.

ACTIVIDAD DE LACASAS (U/ml)				
	ABTS	DMP	GUAY	SYR
Micelio (control)	3.67	34.16	1.22	26.15
Contacto	3.56	22.07	1.26	25.21

Cuadro 21. Actividad de lacasas observada en dos zonas distintas de una colonia de *Pleurotus ostreatus* en el momento de sobrecrecer en antraceno, medio EMA, 20°-26°C.

ACTIVIDAD DE LACASAS (U/ml)				
Sustrato de evaluación	ABTS	DMP	GUAY	SYR
Micelio (control)	10.89	28.32	1.97	15.05
Contacto	10.02	29.94	1.08	20.15

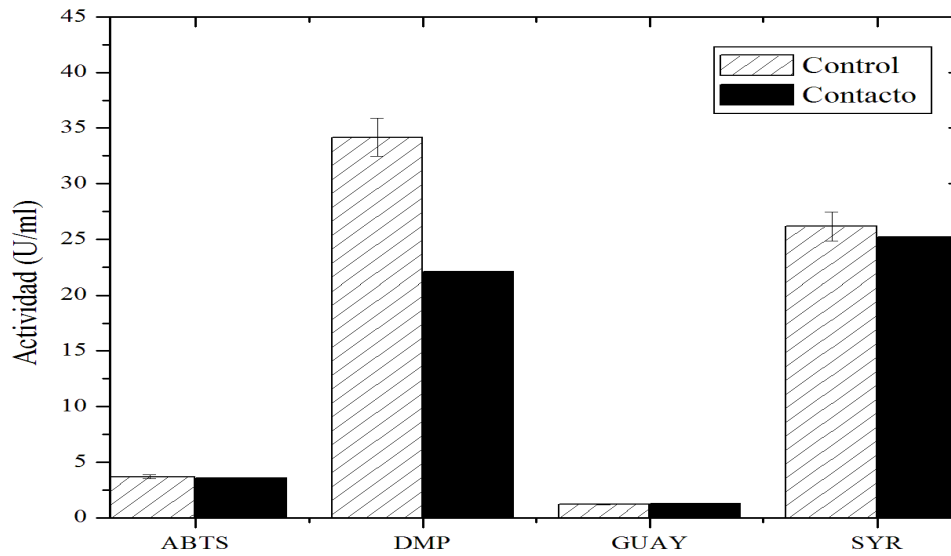


Figura 88. Actividad de lacasas del micelio en contacto con el antraceno (tratamiento) y el micelio que se encontraba en el lado opuesto al antraceno (control), de una misma colonia de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, medio EMA, 20°-26°C.

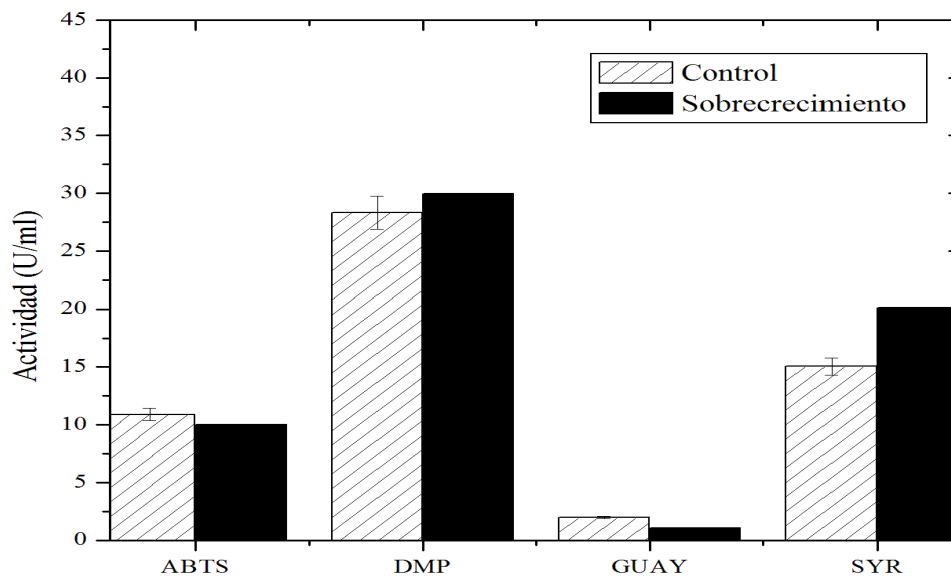


Figura 89. Actividad de lacasas del micelio sobrecreciendo en antraceno (tratamiento) y del micelio que se encontraba en el lado opuesto al antraceno (control), de una misma colonia, de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, medio EMA, 20°-26°C.

2.4.4. Área micelial

El área del crecimiento micelial fue evaluada en cada uno de los tiempos en los que se analizó la actividad de lacasas, en medio EMA, con y sin la adición de ABTS (Cuadros 22-23 y Figuras 90-91). Estadísticamente (ANEXO III) no se observó una diferencia muy importante en el área obtenida entre los controles y los tratamientos (Análisis de varianzas para comparación de medias, con un alfa = 0.05 y tres repeticiones).

Cuadro 22. Área micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia y ausencia de antraceno en los diferentes tiempos evaluados, medio EMA, 20°-26°C.

TRATAMIENTOS	ÁREA DEL MICELIO (cm ²)
C+ T1	4.89
Tx T1	4.64
C+ T2	17.27
Tx T2	21.60
C+ T3	28.88
Tx T3	26.62

C= Control, Tx= Tratamiento, T1= 3 días, T2= 8 días, T3= 15 días.

Cuadro 23. Área micelial evaluada en el crecimiento de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en medio EMA suplementado con ABTS 0.5 mM, 20°-26°C.

TRATAMIENTOS	ÁREA DEL MICELIO (cm ²)	ÁREA DEL HALO (cm ²)
C+ T1 ABTS	1.64	12.47
Tx T1 ABTS	1.99	15.00
C+ T2 ABTS	12.28	25.83
Tx T2 ABTS	9.54	26.96
C+ T3 ABTS	17.66	33.19
Tx T3 ABTS	18.80	58.04

C= Control, Tx= Tratamiento, T1= 3 días, T2= 8 días, T3= 15 días.

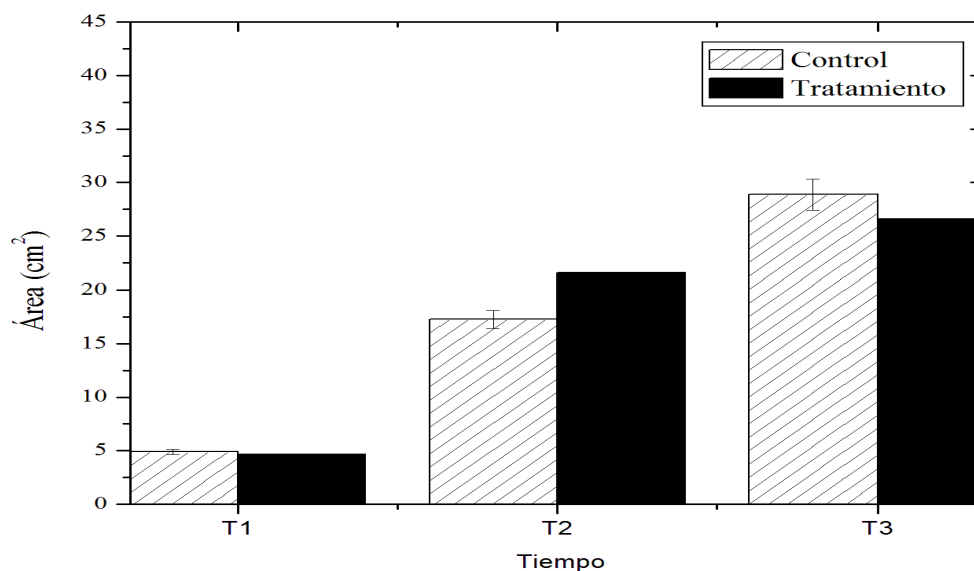


Figura 90. Área de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia y ausencia de antraceno, en los tres tiempos evaluados. Medio EMA, 20°-26°C.

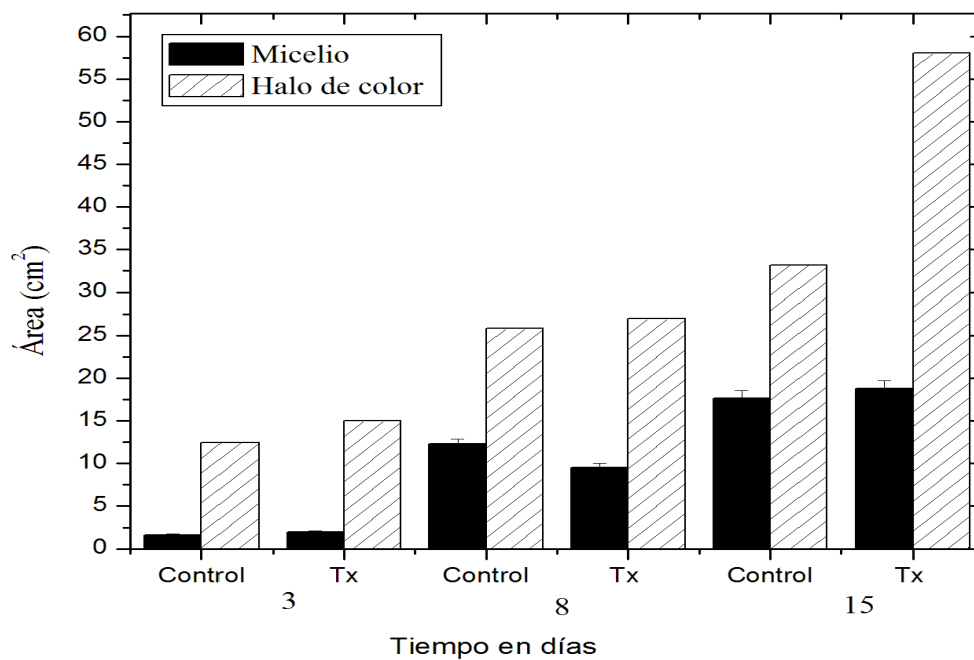


Figura 91. Área de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia y ausencia de antraceno en los tres tiempos evaluados. Crecida en medio EMA suplementado con ABTS 0.5 mM, 20°-26°C.

2.4.5. Producción de proteína

La producción de proteína obtenida entre controles y tratamientos no mostró diferencia estadísticamente significativa, con el análisis de varianza para comparación de medias de Tukey, con un alfa = 0.05 y tres repeticiones (ANEXO III). Sin embargo, fue notoria una producción mayor de proteína para el micelio de *Pleurotus ostreatus* que creció en presencia de antraceno, a diferencia del micelio crecido sin la adición de este compuesto en el medio, especialmente en el momento del primer contacto entre el micelio y el antraceno (tiempo 2), en donde se obtuvieron más de 15 mg/ml de proteína en el tratamiento y solo alrededor de 13 mg/ml en el control (Figura 92).

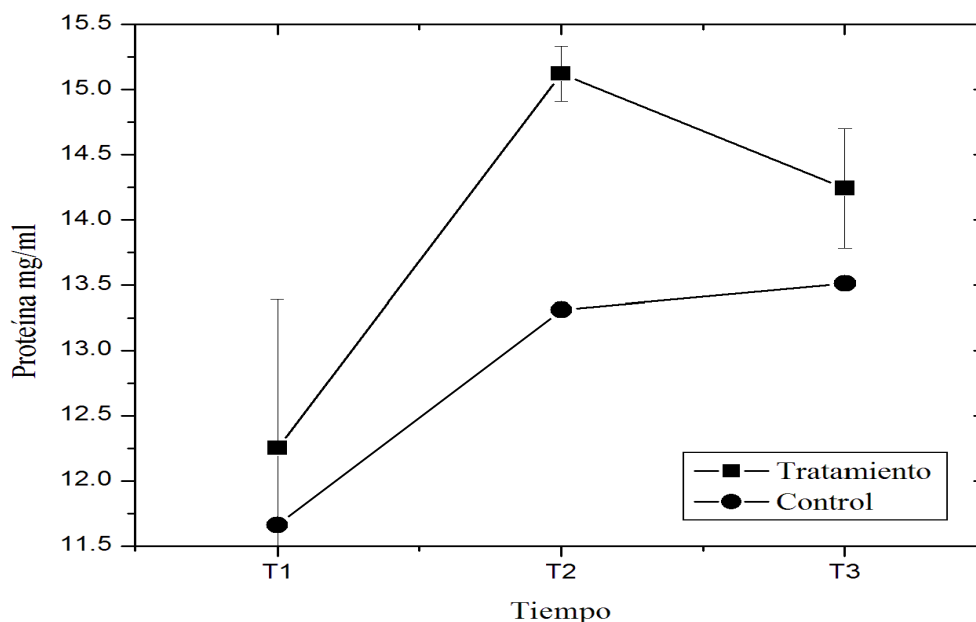


Figura 92. Producción de proteína de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia y ausencia de antraceno. Medio EMA, 20-26° C.

En el caso de los medios adicionados con ABTS, la concentración de proteína obtenida fue menor a la encontrada en los medios sin ABTS, donde se obtuvo un máximo de 14.02 mg/ml de proteína, para el micelio crecido en medio EMA con antraceno y ABTS, a diferencia de los 15 mg/ml que se obtuvieron en el micelio crecido en medio EMA con antraceno pero sin ABTS. El

control mostró en ambos casos (medio con y sin ABTS) un incremento en la producción de proteína hasta alcanzar valores cercanos a los 14 mg/ml (Figuras 92-93, Cuadros 24-27).

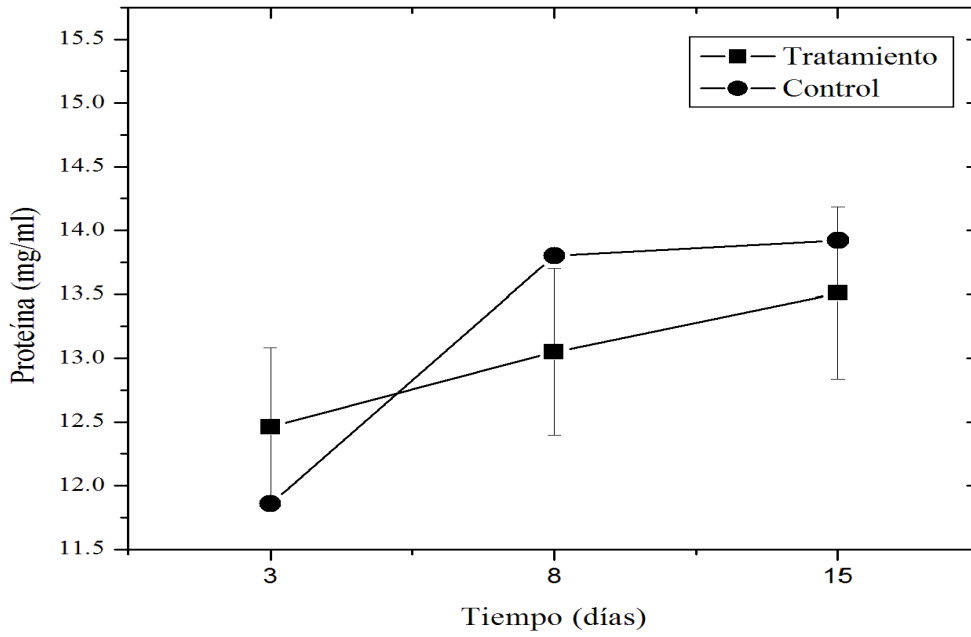


Figura 93. Producción de proteína de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia y ausencia de antraceno. Medio EMA adicionado con ABTS, 20-26° C.

Cuadro 24. Producción de proteína de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* control, medio EMA, 20°-26°C.

	TIEMPO 1 (3 DÍAS)		TIEMPO 2 (8 DÍAS)				TIEMPO 3 (15 DÍAS)	
	Control positivo micelio		Control positivo micelio		Control en posición de contacto		Control positivo micelio	
	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)
Promedio	0.28	11.66	0.33	13.95	0.30	12.67	0.32	13.51

Abs = Absorbancia, P= Proteína.

Cuadro 25. Producción de proteína de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno, medio EMA, 20°-26°C.

	TIEMPO 1 (3 DÍAS)		TIEMPO 2 (8 DÍAS)		TIEMPO 3 (15 DÍAS)	
	Tratamiento micelio		Tratamiento micelio		Tratamiento sobrecrecido	
	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)
Promedio	0.29	12.25	0.36	15.12	0.34	14.24

Abs = Absorbancia, P= Proteína.

Cuadro 26. Producción de proteína por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* control, medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26°C.

	TIEMPO 1 (3 DÍAS)		TIEMPO 2 (8 DÍAS)		TIEMPO 3 (15 DÍAS)			
	Control positivo micelio		Control positivo micelio		Control positivo contacto		Control positivo micelio	
	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)
Promedio	0.28	11.86	0.33	13.80	0.30	12.63	0.43	15.21

Abs = Absorbancia, P= Proteína.

Cuadro 27. Producción de proteína por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno, medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26°C.

	TIEMPO 1 (3 DÍAS)		TIEMPO 2 (8 DÍAS)		TIEMPO 3 (15 DÍAS)			
	Tratamiento micelio		Tx micelio		Tratamiento micelio		Tratamiento contacto	
	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)	Abs	P (µg/ml)
Promedio	0.30	12.46	0.31	13.05	0.34	14.03	0.31	12.99

Abs = Absorbancia, P= Proteína.

2.5. DISCUSIÓN

El interés por utilizar nuevos métodos en la solución de problemas ambientales se ve favorecido por el uso de los hongos y las enzimas que estos producen, en especial, enzimas como las lacasas que están involucradas en la degradación de compuestos tóxicos. Por lo que, recientemente se ha incrementado el interés por estudiar y aplicar estos recursos. Diversos

estudios científicos muestran el efecto de las enzimas lacasas purificadas, directamente sobre el compuesto contaminante en condiciones *in vitro*, ejemplos de estos son los trabajos de Majcherczyk *et al.* (1998) Han *et al.* (2004), Johannes y Majcherczyk (2000), Hu *et al.* (2009) y Collins *et al.* (1996) con lacasas de *Trametes versicolor* y los trabajos de Cambria *et al.* (2008) con lacasas de *Rigidoporus lignosus*. Así como la inmovilización de los hongos en sustratos inorgánicos, tales como alginatos o bagazo de caña (Domínguez, 2007; Mohammadi y Nasernejad, 2009), o la inmovilización de las enzimas purificadas (Hu *et al.*, 2009).

Sin embargo, existe información que indica que las lacasas (purificadas y/o inmovilizadas) no parecen transformar eficientemente a los HAPs, sino que requieren de ser incubadas junto con compuestos intermediarios, tales como el ABTS o el HBT (Majcherczyk *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 1996; Cambria *et al.*, 2008), u otros compuestos que sirvan como mediadores naturales, tales como: fenol, anilina, ácido 4-hidroxibenzoico o alcohol 4-hidroxibenzílico (Johannes y Majcherczyk, 2000). Por lo que se deduce, que la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos requiere de otros factores adicionales a las lacasas, producidas por los mismos hongos. Li *et al.*, (2010), utilizaron extractos crudos de los sustratos de crecimiento de *P. eryngii* en procesos de degradación y observaron que estos extractos contenían menor actividad enzimática, sin embargo, degradaron mayor cantidad de antraceno que la lacasa pura, aún cuando esta última presentaba una actividad enzimática mayor. Aunado a los costos y a la complejidad de la purificación, la utilización del micelio o de los sustratos residuales directos del desarrollo de los hongos, pudiera resultar más beneficioso y económico a la utilización de las lacasas purificadas, ya que los hongos pueden aportar al medio otros metabolitos que pueden contribuir a mejorar el proceso de degradación.

Así mismo, se encuentran citados en la literatura reportes de la relación que existe entre la producción de enzimas y la degradación de los HAPs con diferentes hongos comestibles, que han sido crecidos en presencia de diversos HAPs, mostrando la concordancia entre la degradación de estos y la actividad enzimática de los hongos, las enzimas biodegradadoras reportadas han sido lacasas, MnP (manganeso peroxidases), LiP (lignino peroxidases) y Citocromo P450 (Covino *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2009). Son muy pocos los estudios de degradación *in vitro* en medios de crecimiento con agar, la literatura reporta estudios con bacterias, en las que se agregó una

solución del HAP en la superficie del medio y se inoculó posteriormente la bacteria en busca de halos que mostraran la producción enzimática (Um y Chang, 2010; Kiyohara *et al.*, 1982).

La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* evaluada en este estudio, demostró tolerar, crecer y producir actividad de lacasas en presencia de antraceno, desarrollándose directamente sobre medio de cultivo con agar y en contacto directo con altas concentraciones de polvo de antraceno. En el tiempo 1 (3 días de crecimiento), es decir, en el tiempo en el que el hongo se encontraba creciendo en presencia de antraceno aún sin entrar en contacto directo con él. El crecimiento micelial de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* se vió estimulado en su desarrollo, mostrando hifas especialmente dirigidas hacia el compuesto, igualmente esta fue la etapa en donde se observó la mayor producción de actividad de lacasas y la mayor diferencia entre la actividad enzimática presentada por el tratamiento y la presentada por el control (aun cuando no hubo diferencia estadísticamente significativa en el análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones (ANEXO III).

La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* crecida en presencia de antraceno alcanzó un pico máximo de actividad de 28.06 U/ml, utilizando syringaldazina como sustrato enzimático oxidante; En cambio, cuando creció sin antraceno, el pico máximo de actividad se presentó a partir del tiempo 2 (8 días de crecimiento y fue de 25.21 U/ml, al oxidar al mismo sustrato enzimático.

Fue notorio además, la disminución de la actividad y el desarrollo micelial durante en el primer contacto directo con el polvo de antraceno, y la re-estimulación de los mismos cuando el micelio sobrecreció al compuesto.

De manera confirmativa, los análisis realizados en diferentes zonas de una misma colonia, corroboraron que el antraceno tuvo un efecto sobre la producción de actividad de lacasas para la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*. Ya que aún cuando no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento, con el análisis de varianza y la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones, fue evidente que hubo un estímulo en la producción de actividad de lacasas de la cepa CP-50 en presencia de antraceno. Se observó una divergencia entre la actividad presentada en la zona de

contacto (micelio-antraceno) con la presentada en la zona más alejada al punto de contacto, dentro de la misma placa petri. En cambio, se notó una tendencia de menor actividad de lacasas en el micelio ubicado en la zona de contacto, a diferencia del micelio de la zona más alejada del antraceno. De manera inversa, cuando el micelio nuevamente creció abundantemente sobre el antraceno se presentó entonces, una actividad de lacasas mayor en el micelio sobrecreciendo en antraceno, que en el micelio alejado del punto de contacto. Estas observaciones concuerdan con las obtenidas en la evaluación anterior de la cepa en presencia y ausencia de antraceno, en diferentes cajas de Petri realizadas en este estudio.

El comportamiento presentado por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* fue distinto entre tratamientos y control, por lo que se descarta que la diferencia de actividad de lacasas presentada por el hongo en los distintos tiempos del desarrollo, pudieran deberse también a los ciclos naturales de producción enzimática del hongo. Los resultados de actividad enzimática presentados por el hongo en distintos puntos de una misma colonia, pueden sugerir que el micelio del hongo detectó la presencia del compuesto tóxico, lo que ocasionó la activación de su metabolismo, modificando su comportamiento enzimático y sus patrones del crecimiento micelial.

La concentración de proteína y el área micelial fueron evaluadas junto con la actividad de lacasas para cada uno de los casos. Se observó que el área del crecimiento micelial presentó diferencia entre los valores obtenidos de los controles y los tratamientos, especialmente en el tiempo 2, en donde se alcanzó el punto de contacto entre el micelio y el antraceno, en este punto se observó un área 25% mayor en el tratamiento comparado con el control, en los tiempos 1 y 3 (antes del contacto y sobrecreciendo el antraceno, respectivamente) la diferencia en el área micelial, entre el tratamiento y el control, fue muy pequeña, solamente entre 5% y 8% mayor en el caso del control. Estadísticamente no hubo diferencia significativa, con el análisis de varianza y la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones (ANEXO III), lo cual pudiera indicar que la presencia del antraceno, aún en concentraciones tan altas como la utilizada en este estudio, no representó una limitante para el desarrollo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* (Figura 96).

Igualmente fue notoria la producción de proteína durante el desarrollo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*. Específicamente en el tiempo 2 (8 días) fue donde se notó la mayor producción, el micelio crecido en presencia de antraceno presentó cerca de 8% mayor producción de proteína que el micelio control. Esto confirmó nuevamente el efecto del antraceno en el metabolismo del hongo, ya que el micelio del tratamiento se mostró más activo que el micelio del control. En el caso de los medios adicionados con ABTS, la mayor producción de proteína se alcanzó hasta el tiempo 3 (15 días), debido posiblemente al efecto del sustrato enzimático presente en el medio, el cual fue causa visible de disminución de crecimiento micelial, lo que ocasionó que el tiempo 3 (15 días) fuera el tiempo en el que se contactó directamente el micelio y el antraceno, en lugar del tiempo 2 (8 días), como en los medios sin ABTS.

El método que se presenta en este estudio demostró que es posible evaluar hongos basidiomicetos con potencial biorremediador de HAPs, de una forma muy simple y utilizando grandes dosis de tóxicos en medios de cultivo adicionados con agar. La dosis máxima que se empleó en la evaluación de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* fue de 0.1 g/25 ml de medio con agar, lo que equivale a 4,000 mg/L, más alta a las reportadas en la literatura en medios de cultivo sumergido. Patel *et al.* (2009) emplearon 70 mg/L de fluorantreno, Chávez-Gómez *et al.* (2003) 200 mg/L de antraceno, Covino *et al.* (2010) 25 mg/L de antraceno, Cajthaml *et al.* (2008) 0.5 mg por frasco (de 250 ml) de antraceno y Han *et al.* (2004) 100 mg/L de fenantreno.

La concentración de antraceno y otros HAPs en el petróleo crudo es muy variable y no se puede generalizar para todos los tipos de petróleo, ya que la composición del petróleo dependerá del yacimiento y de la zona donde se haya formado, por lo que no puede definirse una concentración única de antraceno como referencia para este estudio. Cada tipo de petróleo crudo contiene una inmensa variedad de hidrocarburos en concentraciones muy diversas. Sin embargo, se puede mencionar el trabajo de Arias *et al.* (2010), quienes reportaron concentraciones de antraceno de 57 hasta 207 ppb, en 6 sedimentos de diferentes estaciones del estuario de Bahía Blanca, Argentina. Por su parte la EPA reporta la concentración máxima calculada de algunos HAPs que pudieran disolverse en 69 tipos de petróleos distintos, en el caso específico del antraceno serían 17 mg/kg (Cuadro 28).

Cuadro 28. Concentración de diversos HAPs reportados en el petróleo crudo.

HAP	mg/kg
Naftaleno	3,700.0
Acenafteno	58.0
Antraceno	17.0
Tolueno	380.0
Benzoantraceno	16.0
Fluorantreno	15.0
Criseno	120.0
Pireno	9.2
Dibenzoantraceno	8.0
Benzopireno	8.0
Benzofluorantreno	14.0

Fuente: EPA 1978.

Por último, existen estudios que reportan el efecto de los hongos sobre la degradación de los compuestos en ambientes naturales como el suelo, Leonardi *et al.* (2007), investigaron el impacto de la biodisponibilidad de los HAPs en la eficiencia de la micoremediación en suelos. Incubaron los suelos con los hongos *Irpex lacteus* y *Pleurotus ostreatus* y demostraron la eficiencia de los hongos en la biorremediación y el efecto negativo de los coadyuvantes en la biorremediación de los HAPs por hongos.

La diversidad del comportamiento de los sustratos enzimáticos en la oxidación de las lacasas para detectar la actividad enzimática, permitieron escoger a los sustratos DMP y Syringaldazina como los mejores, por ser los más sensibles a la oxidación por la presencia de las lacasas, seguidos por el sustrato enzimático ABTS y finalmente, el sustrato enzimático guayacol, que reaccionó muy debilmente y por lo tanto no se sugiere como sustrato enzimático de evaluación de lacasas en las condiciones empleadas en este ensayo (Figuras 94-97).

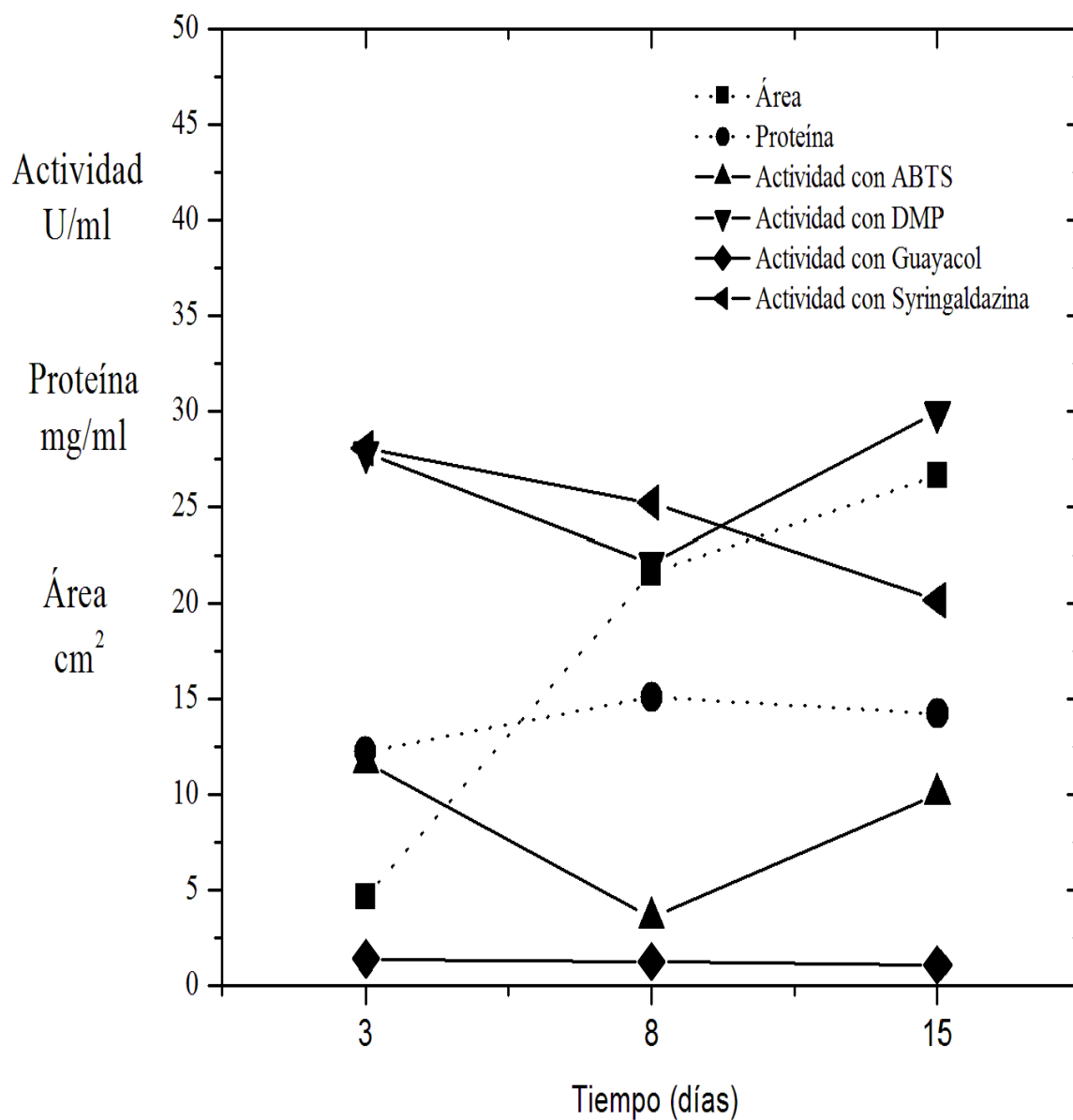


Figura 94. Parámetros de desarrollo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno, medio EMA, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.

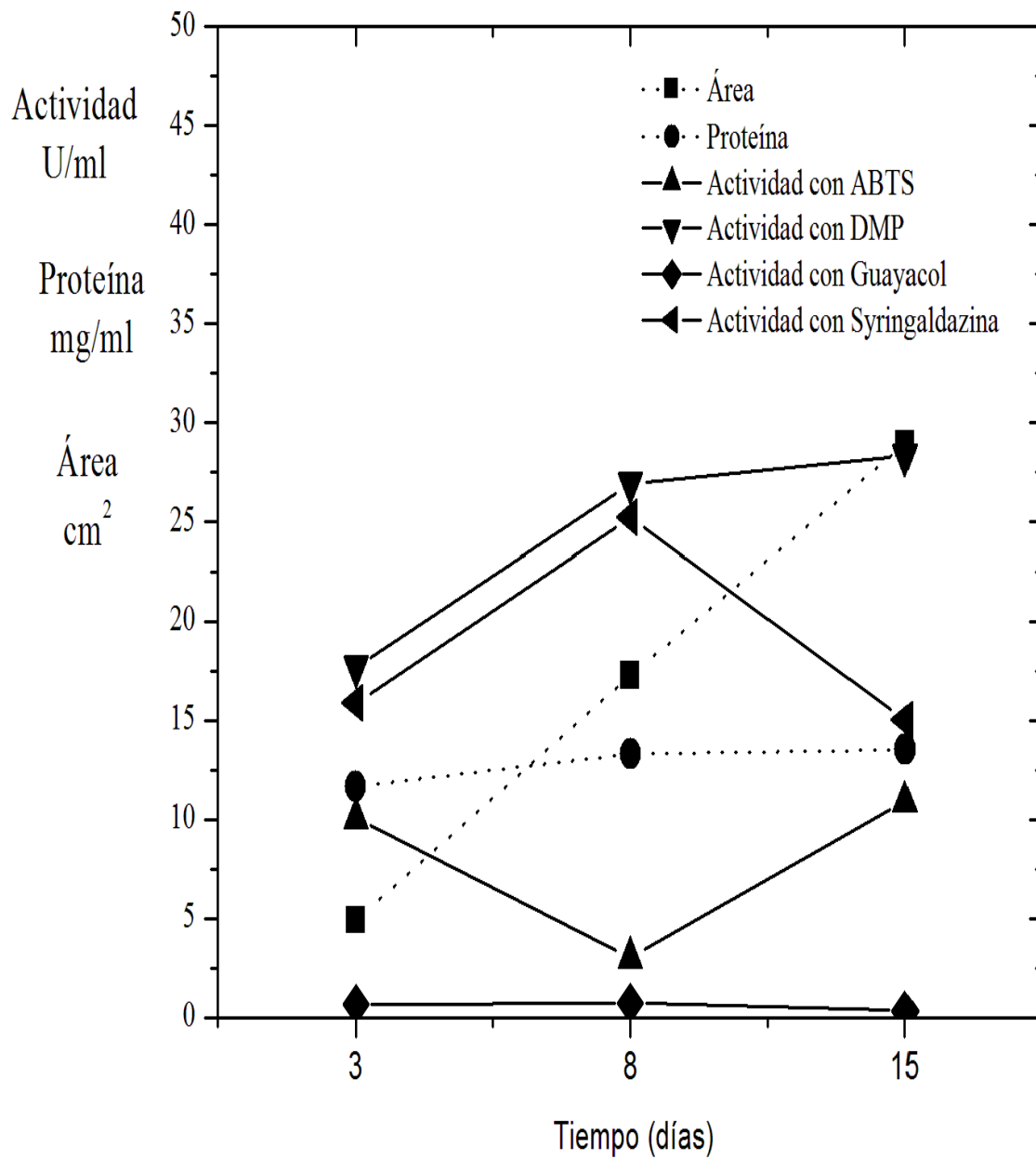


Figura 95. Parámetros de desarrollo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en ausencia de antraceno, medio EMA, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.

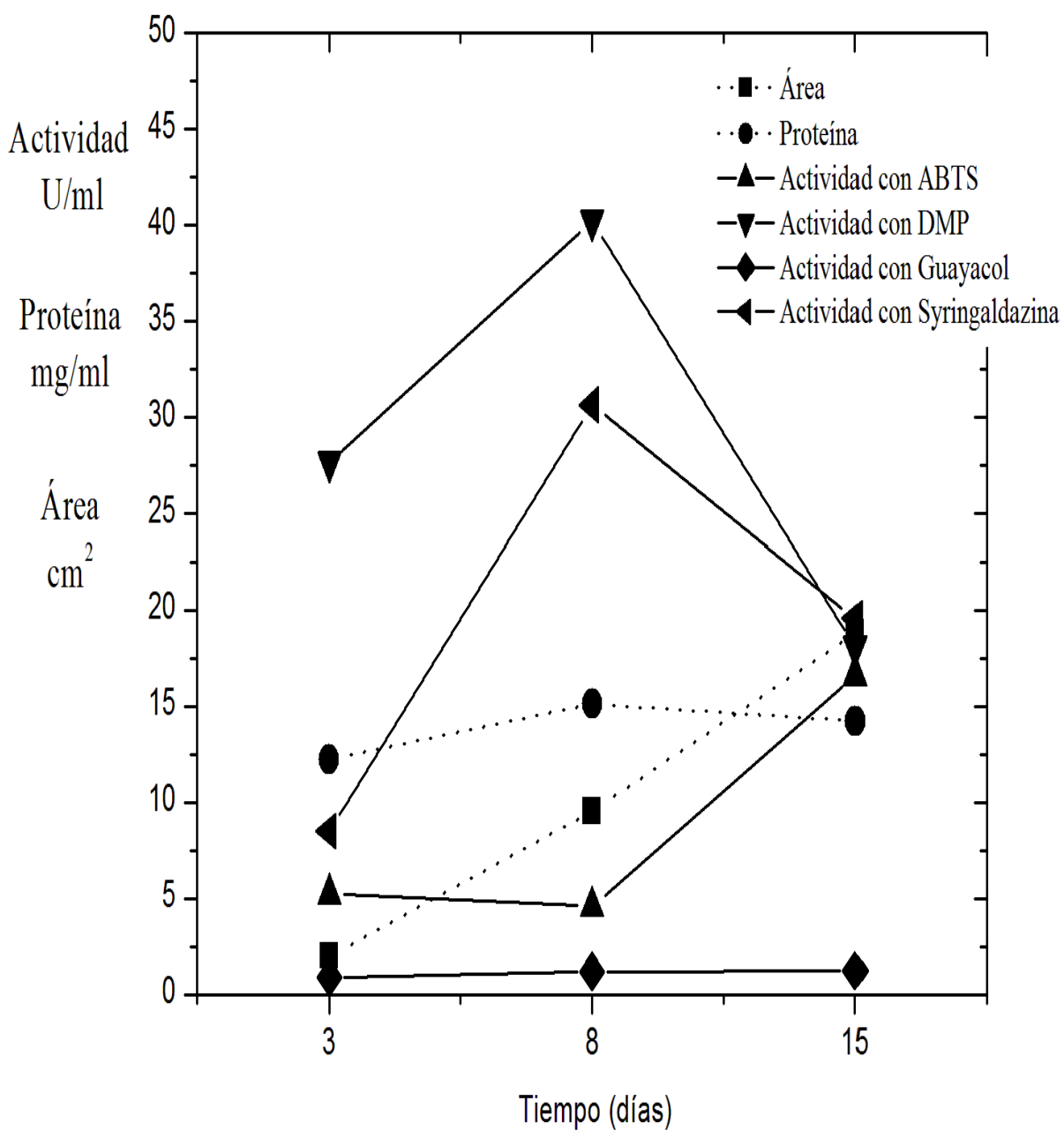


Figura 96. Parámetros de desarrollo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno, medio EMA adicionado con ABTS 0.5 mM, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.

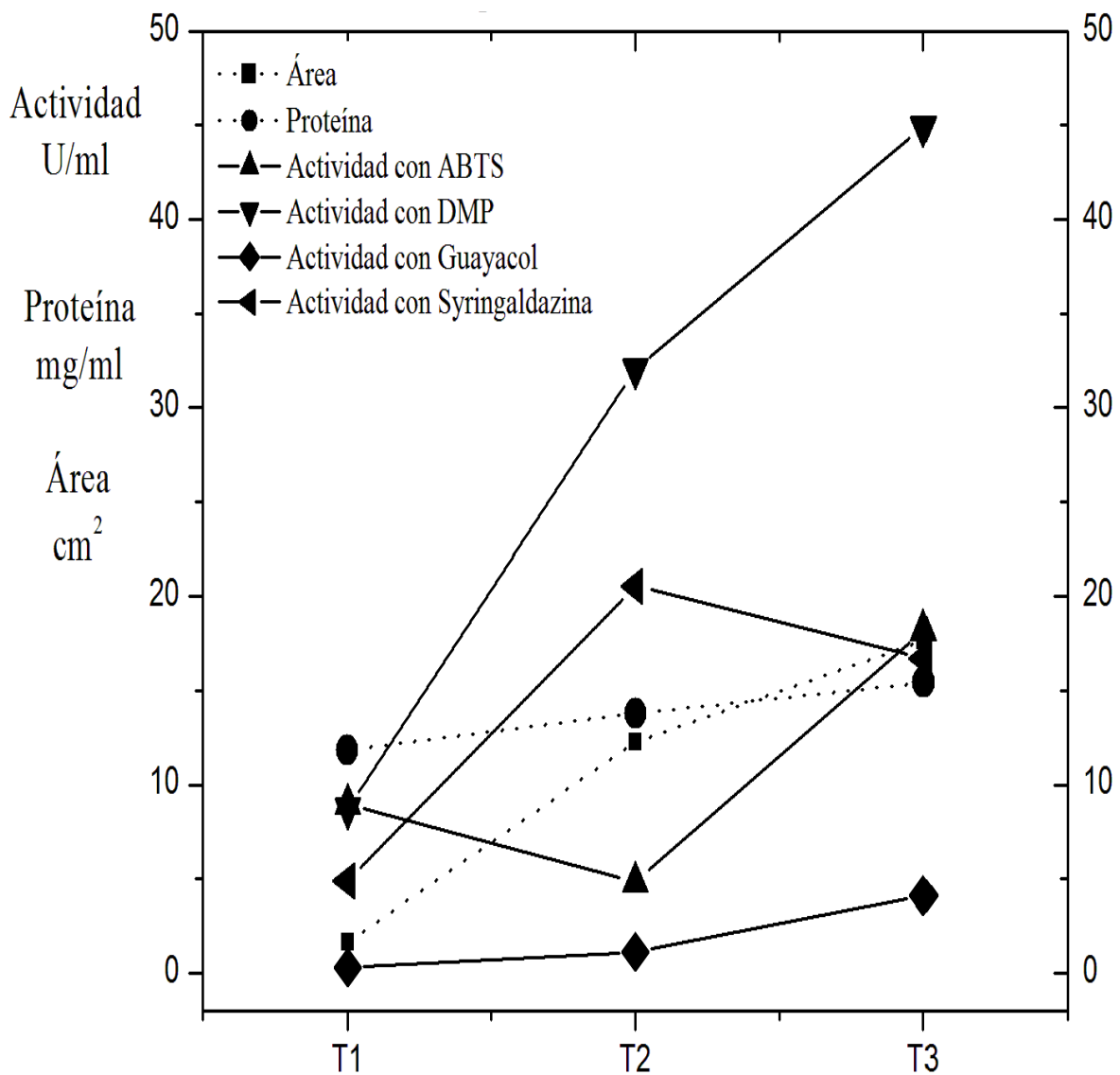


Figura 97. Parámetros de desarrollo de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en ausencia de antraceno, medio EMA adicionado con ABTS, 20°-26°C. La actividad de lacasas fue evaluada con cuatro sustratos enzimáticos distintos.

2.6. CONCLUSIONES

La cepa de *Pleurotus ostreatus* seleccionada por su importante actividad de lacasas mostró tener la capacidad para crecer y producir actividad de lacasas en presencia de antraceno, por lo cual se confirmó su potencial para ser utilizada en una estrategia de biorremediación en suelos contaminados con este compuesto. La cepa de *Pleurotus ostreatus* mostró un desarrollo más activo en la presencia del antraceno colocado en el medio de cultivo EMA, y se vio reflejado en la actividad de lacasas y en el desarrollo de hifas atraídas hacia el compuesto. En la zona del primer contacto entre hifas y antraceno se observó una etapa de adaptación con una ligera disminución de la velocidad de crecimiento y de la actividad de lacasas. En la zona de sobrecrecimiento de la cepa CP-50 en antraceno, se demostró nuevamente un estímulo en el crecimiento y la actividad de lacasas.

El método establecido en este estudio resultó ser un método fácil y práctico de utilizar. Es un método que permite evaluar la capacidad de los hongos comestibles para producir actividad enzimática en condiciones de alto estrés, además de evaluar la tolerancia de los hongos para crecer directamente en contacto con altas concentraciones de compuestos tóxicos contaminantes.

La utilización del sustrato enzimático ABTS en los medios de cultivo, como indicador de la actividad de lacasas, no es muy útil cuando la finalidad del trabajo incluye la evaluación con diferentes sustratos enzimáticos oxidantes, debido a que se observó que algunos de los sustratos enzimáticos empleados para la cuantificación de la actividad reaccionan con el ABTS adicionado al medio, y causan cambios inesperados en las lecturas de absorbancias. Además, se observó que el sustrato enzimático ABTS adicionado al medio de cultivo interfiere directamente en el desarrollo del hongo CP-50, provocando que el crecimiento sea más lento y no se alcance el pico máximo de actividad al tiempo 1, como en los tratamientos sin ABTS, sino hasta el tiempo 2 (una semana después).

2.7. RECOMENDACIONES

Los resultados presentados en el presente trabajo demuestran el potencial biorremediador de los hongos comestibles en las pruebas realizadas en laboratorio, por lo que los estudios siguientes deberían enfocarse en analizar el efecto biorremediador de estos hongos directamente en los suelos contaminados. La realización de las pruebas en campo con sustratos y micelio residuales del crecimiento de los hongos comestibles, permitirá analizar las condiciones y factores que favorezcan o limiten el desempeño de las enzimas lacasas en el proceso de biorremediación. Así como también, se sugieren estudios de mejora y optimización de los métodos establecidos y la selección de nuevos hongos comestibles con potencial biorremediador, utilizando el método descrito en este trabajo.

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA PARA EL MANEJO Y APLICACIÓN DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCTORAS DE LACASAS, EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN *IN SITU* DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

3.1. INTRODUCCIÓN

Como subproducto de la obtención comercial de hongos comestibles, se generan en el país más de 500,000 toneladas anuales de sustratos orgánicos residuales, parcialmente degradados, los cuales contienen cuando menos 2,000 kg de lacasas (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). Además de otras enzimas como xilanasas y celulasas (Márquez-Araque *et al.*, 2007).

Estos sustratos residuales están formados principalmente por diversos materiales lignocelulósicos de origen agrícola, agroindustrial y/o forestal. En la actualidad, una parte de estos subproductos se recicla, composteados con otros materiales orgánicos o sin compostear, como abono orgánico de buena calidad para la producción de plantas y árboles en vivero, o para la agricultura, la industria hortícola, y la floricultura. El resto de los sustratos residuales, degradados permanecen subutilizados (Martínez-Carrera, 2002).

El hecho de que las enzimas responsables de la degradación de la lignina sean extracelulares, secretadas al medio durante la fase vegetativa del crecimiento micelial, hace posible encontrarlas inmovilizadas dentro del sustrato residual de crecimiento micelial, el cual constituye una verdadera matriz orgánica compuesta por: materiales lignocelulósicos parcialmente degradados, biomasa micelial que penetra y recubre el sustrato residual, exoenzimas fúngicas (lacasas, manganeso-peroxidasas, celulasas), el resto del secretoma micelial (proteínas secretadas por las hifas y microbiota asociada como bacterias y actinomicetes, entre otros) (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

Las características únicas de estos sustratos residuales del crecimiento, permiten pensar en procesos alternativos de biorremediación induciendo la degradación de los compuestos tóxicos, ya sea con la mezcla sustrato-suelo o utilizando compost del sustrato residual de crecimiento mezcladas con el suelo (Eggen, 1999; Lau *et al.*, 2003). De la misma manera, las aplicaciones potenciales de esta matriz orgánica para la biorremediación *in situ* no se limita sólo a la degradación directa por enzimas fúngicas, sino también a procesos de bioaumentación y bioestimulación. Los hongos comestibles tienen un gran potencial para ser estudiados y utilizados como una herramienta dentro de los métodos de biorremediación que actualmente se emplean.

El sistema de producción y consumo nacional de hongos es cada vez más complejo y competitivo, está ubicado en un contexto donde las oportunidades de mercado cambian rápidamente. El desarrollo de la industria mexicana productora de hongos comestibles, tiene una fuerte competencia externa por el incremento de las importaciones y por la drástica disminución de la demanda derivada de la crisis económica (Mayett y Martínez-Carrera, 2010).

Considerando la relevancia social, económica y ecológica de la producción comercial de los hongos comestibles y el papel crucial que juegan los hidrocarburos en el país, así como los efectos de los derrames de estos en nuestros suelos agrícolas, resulta de vital importancia el planteamiento de estrategias integrales. Estas estrategias deben considerar la producción de insumos para la biorremediación de los suelos agrícolas afectados, tener repercusión en los principales sectores de la cadena productiva de los hongos, desde los productores, distribuidores y consumidores de hongos, y fomentar el uso de los materiales propios de la región, en un proceso planificado, que garantice el posterior uso de los mismos en los procesos de recuperación de suelos dañados.

Es por esto que en la presente estrategia se plantean los siguientes objetivos:

- Proponer una alternativa al saneamiento de los suelos agrícolas afectados por derrames de petróleo, lo que permitirá a su vez mejorar las condiciones del suelo, así como incrementar los rendimientos de los cultivos y obtener alimentos más sanos.

- Diversificar el uso de los materiales de desecho de la producción de hongos, ya que actualmente es limitado el uso que se les da en nuestro país a estos sustratos, algunos se transforman en alimento para ganado, otros se compostean y se adicionan nuevamente al suelo y otros más se utilizan como fuente de energía, sin embargo, en la mayoría de los casos se tiran sin ningún tratamiento.
- Contribuir a la cultura del consumo de hongos en México, promoviendo la producción y uso en zonas rurales, especialmente en las afectadas por derrames de petróleo.
- Aportar conocimiento sobre el desempeño de los hongos comestibles en la biorremediación de suelos agrícolas que han sufrido accidentes por derrames de petróleo crudo, con lo que se construirán las bases de nuevos métodos de restauración de suelos, más eficientes y ambientalmente más amigables.

3.2. ACTORES DE LA ESTRATEGIA

1. Los agricultores y campesinos, propietarios de los suelos agrícolas afectados por los derrames de petróleo.
2. Los productores o posibles productores de hongos de las zonas afectadas o zonas aledañas, quienes pudieran participar en las actividades de producción de hongos comestibles y en el saneamiento de los suelos de la zona, ya que con la producción de hongos comestibles, se puede aportar el material residual del proceso de producción de hongos, que constituye un insumo potencial para la biorremediación de los suelos siniestrados por derrames de petróleo.
3. El Colegio de Postgraduados-*Campus* Puebla, que puede proporcionar a los productores, cepas alternativas de hongos comestibles con propiedades degradadoras de residuos de petróleo en suelos. Así mismo, extender el mercado de la producción de hongos comestibles y la diversificación de los usos de los materiales residuales provenientes de la misma, hacia nuevos sectores de la población, atendiendo las necesidades ambientales locales.
4. El sector Gobierno, a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y los demás organismos que están en

posibilidad de brindar apoyos técnicos, financieros y administrativos a los agricultores y campesinos involucrados.

5. Los consumidores finales, tanto de los hongos producidos mediante este proceso, como de los productos alimenticios que resultarán del uso de los predios agrícolas saneados.

3.3. EL SUJETO SOCIAL DE LA ESTRATEGIA

Entre las principales preocupaciones derivadas de los derrames de petróleo en suelos agrícolas, se encuentran los temas concernientes a la salud de las personas que habitan en las zonas afectadas, especialmente importantes los compuestos que se acumulan a través de la cadena alimenticia, constituyéndose estos, entre las principales causas de riesgos sanitarios latentes, así como también las consecuencias económicas y sociales que surgen por las pérdidas de los cultivos. Es por esto, que el principal sujeto social lo constituyen los habitantes de las zonas afectadas, los que además, pueden también ser la parte más importante de la solución del problema desde la perspectiva de esta estrategia, ya que a partir de una producción alimentaria tan importante y benéfica como la de los hongos comestibles, se puede aportar el principal insumo para la biorremediación (el sustrato residual del crecimiento de los hongos comestibles).

3.4. ENFOQUE SOCIAL DEL PROBLEMA

Los accidentes por derrames de petróleo en suelos agrícolas, implican más que un problema puramente ambiental, que aún siendo este grave por sí mismo, por las repercusiones que se generan al entorno, se crean además otros problemas secundarios, no menos graves, que deberán ser considerados para lograr el planteamiento de una solución completa. La visualización del problema y sus principales consecuencias provocadas por la contaminación de los suelos agrícolas como se plantean en este trabajo, están esquematizadas en la Figura 98.

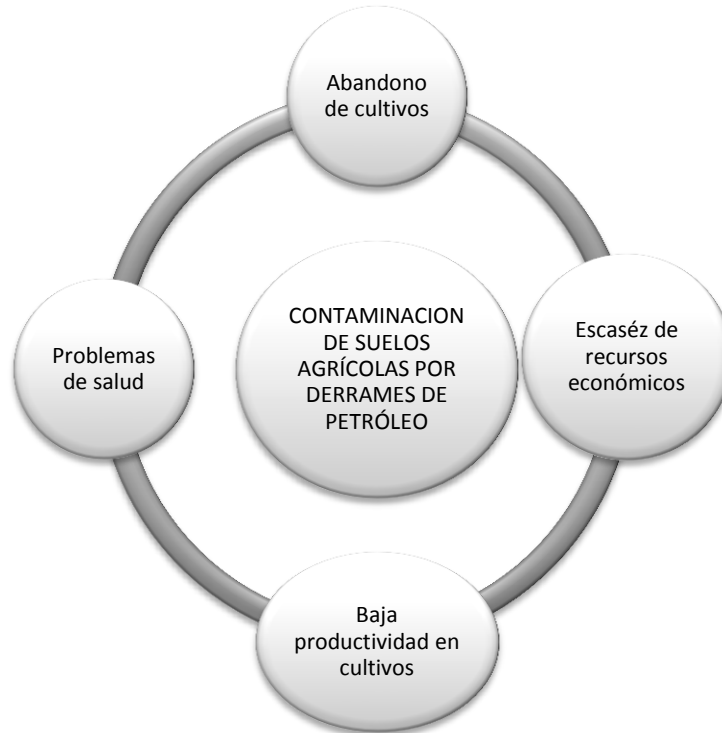


Figura 98. Esquema de la problemática causada por la contaminación de suelos agrícolas con hidrocarburos del petróleo y el uso potencial del hongo *Pleurotus ostreatus* para su biorremediación.

3.5. ESTRATEGIA DE MANEJO Y APLICACIÓN DE LAS CEPAS BIORREMEDIADORAS

La estrategia para biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos, consiste en desarrollar y transferir una tecnología de restauración, basada en la biotecnología de hongos comestibles, que permita la recuperación de los suelos agrícolas afectados, implementando procesos integrales de biorremediación y producción de hongos en las regiones afectadas por los derrames de petróleo. La estrategia propuesta implica la utilización de organismos vivos (hongos comestibles) y los subproductos de su cultivo como una parte fundamental para la completa recuperación de los suelos afectados. El desarrollo de esta estrategia se plantea en tres fases de trabajo científico:

1. Estrategia científica a corto plazo: Biorremediar suelos contaminados con la ayuda de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*. La cepa CP-50 fue seleccionada en este trabajo por su capacidad de producción de enzimas de lacasas y su habilidad para crecer y desarrollarse en altas concentraciones de antraceno.
2. Estrategia científica de mediano plazo. Optimización del proceso de biorremediación de suelos contaminados empleando hongos comestibles. A mediano plazo se puede obtener una optimización del proceso, al conocer las condiciones de cada suelo afectado al que se le aplicará este tipo de tratamiento, así como las características de la enzima en particular y tener las herramientas para poder predecir el resultado esperado de la interacción de estos dos factores, y para optimizar las condiciones de esta relación y lograr el mejor resultado posible. Para la transferencia de la tecnología de manera integral en un proceso de biorremediación al mismo tiempo que de aprovechamiento del recurso de los hongos, se sugiere implementar un estudio de optimización de sustratos de cultivo para la cepa biorremediadora, empleando subproductos agrícolas o agroindustriales propios de cada una de las zonas afectadas.
3. Estrategia científica de largo plazo. Proceso de mejora continua. En donde utilizando el método probado y validado en el presente trabajo de tesis se permita una selección continua de cepas de hongos comestibles con mejores capacidades de biorremediación y en donde se considere la pertinencia de realizar estudios de mejoramiento genético a través de métodos de biología molecular y manipulación genética.

3.6. ACCIONES ESPECÍFICAS DE LA PROPUESTA

Los planos prioritarios para el desarrollo de esta estrategia incluyen la mejora tecnológica y la investigación científica, para la cual se enumera a continuación una lista de actividades específicas que ayudarán a la realización de ésta, según las tres fases cronológicas de desarrollo mencionadas anteriormente. Es importante mencionar que para concretarse cada una de las fases

deberán considerarse además los aspectos de organización, administración, sistemas financieros y articulación a cadenas productivas que sean necesarios.

3.6.1. Estrategia científica a corto plazo

Emplear la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en la biorremediación de suelos agrícolas contaminados. Dado que la cepa CP-50 mostró la mayor producción de lacasas en los ensayos de laboratorio, así como una excelente capacidad para tolerar y hasta estimular su crecimiento en presencia de antraceno, un hidrocarburo aromático policíclico representativo de este grupo. Se propone a esta cepa para la realización de las pruebas piloto de biorremediación *in situ*, utilizando el sustrato residual del crecimiento, el cual contiene micelio y enzimas degradadoras. La formulación inicial del sustrato de crecimiento será el que actualmente se emplea en el laboratorio de hongos comestibles del Colegio de Postgraduados. El sustrato residual podrá transferirse y mezclarse con el suelo de las zonas agrícolas afectadas por derrames de petróleo.

Las actividades necesarias para concluir esta fase son:

- Pruebas de degradación *in situ*. Diseño de un proceso de aplicación del sustrato residual biorremediador a los suelos contaminados.
- Valoración de los niveles de contaminantes antes y después de la aplicación del sustrato residual, empleando los controles pertinentes.
- Evaluación del efecto de diferentes dosis de inóculos de hongo en el sustrato residual sobre el grado de degradación obtenido.
- Evaluación del efecto de la aplicación de sustrato residual en diferentes fases del crecimiento micelial sobre el grado de degradación obtenido.

3.6.2. Estrategia científica a mediano plazo

Los factores más importantes que intervienen en la aplicación de una tecnología biológica para la remediación de suelos (en este caso utilizando lacasas inmovilizadas en los sustratos residuales de crecimiento, y aplicadas a suelos contaminados con hidrocarburos) son susceptibles a una infinidad de condiciones ambientales y fisicoquímicas, por lo que la optimización de un proceso de biorremediación con hongos se verá grandemente influenciada por la compatibilidad

de las enzimas lacasas y la disponibilidad del compuesto contaminante en el suelo. Es por esto, que adquiere gran importancia, la obtención del mayor conocimiento posible de estos factores determinantes. De igual manera, resulta muy importante la optimización de un proceso sustentable, en donde se garantice el suministro de materia prima de remediación, con la ventaja adicional del cultivo de los hongos en zonas próximas a las afectadas.

Las actividades sugeridas para el éxito de esta fase son:

- Estudios de características físicas y químicas de los suelos afectados por derrames de petróleo.
- Caracterización de la enzima lacasa degradadora.
- Estudio prospectivo de la eficiencia de la interacción entre las lacasas, las condiciones fisicoquímicas del suelo y las condiciones ambientales de la zona.
- Elaboración y evaluación (incluyendo la eficiencia del desarrollo del hongo y la capacidad de producción de lacasas) de formulaciones de sustratos de cultivo, para el hongo seleccionado, empleando los subproductos agrícolas o agroindustriales que se generan en zonas aledañas a las afectadas.
- Promover el cultivo de hongos en las zonas rurales afectadas.
- Llevar a cabo pruebas piloto *in situ* de la degradación en los suelos específicos y con los controles pertinentes.

3.6.3. Estrategia científica a largo plazo

Un proceso eficiente y sustentable para la biorremediación de suelos afectados por derrames de petróleo incluirá, sin duda, la adaptación y mejora continua de procesos, a través de la obtención de mejores y más eficientes cepas de hongos biorremediadores, de métodos cada vez más fáciles de aplicar y con resultados obtenidos en menor tiempo y costo. La aplicación de la ciencia a los procesos tecnológicos puede resultar en conocimientos y procesos novedosos con aportaciones importantes para los mismos, por lo que cabe considerar la oportunidad de realizar estudios de mejora continua, aplicando la biotecnología a través de técnicas de biología molecular y la manipulación directa del material genético, para entender a profundidad los aspectos enzimáticos y moleculares relacionados con la biodegradación de hidrocarburos por los

hongos comestibles. Nuevos métodos y desarrollos pueden generar beneficios sociales, económicos, y ecológicos relevantes para México, al ser aplicados en la solución de problemas ambientales específicos. Para acercarse a estos procesos de mejora continua en los programas de biorremediación con hongos comestibles se sugieren las siguientes actividades:

- Selección continua de hongos comestibles biorremediadores, que incluye el análisis de hongos comestibles de diferentes especies y géneros, utilizando el método desarrollado en este estudio, la selección de las mejores cepas, pruebas en campo y la evaluación de la aceptación comercial de los hongos seleccionados para su consumo.
- Optimización de los sustratos de cultivos y de los métodos de biorremediación considerando todos los factores involucrados en el proceso, como se menciona en la estrategia a mediano plazo.
- Mejoramiento genético. Selección de genes y sobreexpresión de genes codificantes de lacasas en hongos comestibles. La transformación de organismos con genes que expresen lacasas, puede llevar a una producción considerablemente incrementada de estas enzimas en los organismos naturalmente productores o hasta en organismos normalmente no productores.

IV. CONCLUSIONES GENERALES

Puede concluirse que la mayor actividad de lacasas la registraron las cepas del género *Pleurotus*, especialmente la cepa de *Pleurotus ostreatus*, seguido de otras especies del mismo género, después por las especies del género *Lentinula*, y por último las del género *Ganoderma*, ya que las cepas evaluadas de este género prácticamente no presentaron actividad de lacasas. Algunas cepas como la CP-18 a pesar de pertenecer al género de *Pleurotus* (*Pleurotus cystidiosus*), no registró actividad importante de lacasas.

Se observó que el crecimiento micelial, así como la capacidad de producción de actividad de lacasas es particular para cada una de las cepas.

La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* fue seleccionada por su importante actividad metabólica, ya que mostró ser una cepa capaz de crecer y producir actividad de lacasas en presencia de antraceno, por lo que se eligió como la cepa potencial para ser usada en una estrategia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.

Las observaciones registradas sobre el comportamiento de la cepa de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno, incluyeron, la estimulación del crecimiento al percibir la presencia del antraceno, que se vió reflejada en la actividad de lacasas y en el desarrollo de las hifas dirigidas hacia el compuesto, hasta alcanzarlo, en donde se presentó una etapa de adaptación o disminución temporal en la velocidad de crecimiento y la producción de lacasas, para nuevamente verse incrementados ambos componentes al sobrecrecer en el antraceno.

Se logró establecer un método fácil y práctico para evaluar la tolerancia y capacidad de producción enzimática de hongos comestibles, directamente sobre compuestos tóxicos en polvo, utilizando medios de cultivo con agar en placas petri.

Se formuló una propuesta estratégica para el uso de este hongo, en los procesos de biorremediación de suelos agrícolas contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados de derrames de petróleo.

IV. RECOMENDACIONES GENERALES

La continuidad de este trabajo radica en la implementación de la estrategia propuesta, que incluye la utilización de los hongos comestibles como recursos naturales con gran potencial en los procesos de biorremediación de los suelos agrícolas afectados por derrames de petróleo.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Urdapilleta, L., G.A. Alonso Paz, A. Rodríguez, M. Adame, D. Salgado, J. Salgado, M. Montiel-Peña, F. Medrano-Vega, E. C. y Villegas Villarreal. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. Pp. 189-220. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Adams-Schroeders, R. H., V. I. Domínguez Rodríguez y L. García Hernández. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra Latinoamericana* 17: 159-174.
- Arias, A. H., J. E. Marcovecchio, R. H. Freije, G. Ponce-Vélez y A. Vázquez Botello. 2010. Análisis de fuentes y toxicidad equivalente de sedimentos contaminados con HAPs en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Hidrobiológica* 20: 41-56.
- Asgher, M., Y. Sharif y H. N. Bhatti. 2010. Enhanced production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum* IBL-06 using lignocellulosic agricultural wastes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 8: A59.
- Baldrian, P. y J. Gabriel. 2002a. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206: 69-74.
- Baldrian, P. y J. Gabriel. 2002b. Variability of laccase activity in the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Folia Microbiology* 474: 385-390.
- Baldrian, P., C. in der Wiesche, J. Gabriel, F. Nerud y F. Zadrzil. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2471-2478.
- Baker, K. H. y D. S. Herson. 1994. *Bioremediation*. Pp. 375. McGraw-Hill, Nueva York.
- Baker, K. H. y D. S. Herson. 1998. Introduction and overview of bioremediation. Pp. 1. *En: Bioremediation Principles. Series in Water Resources and Environmental Engineering*. Eds. J. B. Eweis, S. J. Ergas, D. P.Y. Chang y E. D. Schroeder. Mc. Graw-Hill. Nueva York.

- Barr D. P. y S. D. Aust. 1994. Mecanismos white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science Technology* 28: 78A-87A.
- Bogan B. W., R. T. Lamar, W. D. Burgos y M. Tien. 1999. Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[α]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in HAP-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology* 284: 250–254.
- Bourbonnais, R. y M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 9–102.
- Bourbonnais R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier y M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1876-1880.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bumpus J. A., W. Ming, D. Tien y S. D. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.
- Cajthaml, T., P. Erbanová, A. Kollmann, Č. Novotný, v. Šašek y C. Mougín. 2008. Degradation of pahs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiology* 53: 289–294.
- Cambria, M. T., Z. Minniti, V. Librando y A. Cambria. 2008. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* and its laccase in the presence of redox mediators. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 149: 1–8.
- Canet R., J. G. Birnstingl, D.-G. Malcolm, J. M. Lopez-Real y A. J. Beck. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology* 76: 113-117.
- Carlile, M. J. y S. C. Watkinson. 1996. *The Fungi*. Pp.482. Academic Press, San Diego.
- Cavallazi, J. R. P., C. M. Kasuya y M. A. Soares. 2005. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 383-387.
- Cerniglia C. E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 324-33.

- Colombo J. C., M. Cabello y A. M. Arambarri. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental pollution* 94: 355-362.
- Collins, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field y A. D. W. Dobson. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4563–4567.
- Cordi, L., R. C. Minussi, R. S. Freire y N. Duran. 2007. Fungal laccase: copper induction, semipurification, immobilization, phenolic affluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology* 6: 1256-1259.
- Covino, S., K. Svobodová, Z. dena Křesinová, M. Petruccioli, F. Federici, A. D'Annibale, M. Čvančarová y T. Cajthaml. 2010. *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresource Technology* 101: 3004-3012.
- Crawford, R. 1981. *Lignin Biodegradation and Transformation*. Pp.154. John Wiley, New York.
- Cullen, D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology* 53: 273-289.
- Chang S.-T. y P. G. Miles. 2004. Overview. Pp. 26. *En: Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Eds. Chang S.-T., P. G. Miles. CRC Press. Boca Ratón.
- Chávez-Gómez B., R. Quintero, F. Esparza-García, A. M. Mesta-Howard, F. J. Zavala Díaz de la Serna, C. H. Hernández-Rodríguez, T. Gillén, H. M. Poggi-Varaldo, J. Barrera-Cortés y R. Rodríguez-Vázquez. 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technology* 89: 177-183.
- Chávez-López C., J. F. Esparza-García, M. E. Hidalgo-Lara, O. Loera-Corral, R. Rodríguez-Vázquez. 2005. Producción de la enzima lacasa por el hongo }Cladosporium cladosporioides en presencia de fenantreno. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana.
- D'Acunzo, F., C. Galli y B. Masci. 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. *European Journal of Biochemistry* 269: 5330-5335.

- D'Souza-Ticlo, D., D. Sharma y C. Raghukumar. 2009. A thermostable metal tolerant laccase with bioremediation potential from a marine derived fungus. *Marine Biotechnology* 11: 725-737.
- Davis, J. B. 1956. Microbial decomposition of hydrocarbons. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48: 1444-1448.
- Del Río, J. C. 2005. Valorización de productos agroforestales para la fabricación de pasta de papel: Caracterización química y modificación estructural de sus constituyentes en los procesos de cocción y blanqueo. Disponible en: <http://www.irnase.csic.es/users/delrio/web-Proy-AGL2005-01748/Proyecto.htm>.
- Desai S. S. y C. Nityanand. 2011. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 98-124.
- Domínguez, A., J. Gómez, M. Lorenzo, A. Sanromán. 2007. Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:367–373.
- Dritsa V., F. Rigas, K. Natsis y R. Marchant. 2007. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. *Bioresource Technology* 98: 1741–1747.
- Eggen T. 1999. Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44: 117-126.
- Eggen T. y A. Majcherczyk. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (HAP) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 111-117.
- Eggen, T. y V. Sasek. 2002. Use of edible and medicinal oyster mushroom [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.)Kumm.] spent compost in remediation of chemically polluted soils. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 255-261.
- EPA 1978. Petroleum Hydrocarbons, Total Recoveral. Meted 418.1 (Spectrophotometric infrared) Storet No. 45501. Disponible en: http://www.unitedchemists.com/AtYourService/AnalyticalMethods/Method_EPA418.1.pdf
- Fernández-Sánchez, J. M., R. Rodríguez-Vázquez, G. Ruiz-Aguilar y P. J. J. Álvarez. 2001. PCB biodegradation in aged contaminated soil: interactions between exogenous *Phanerochaete*

- chryso sporium* and indigenous microorganisms. *Journal of Environmental Science and Health* 36: 1145-1162.
- Ferrera, R., M. E. Lara Hernández y J. E. Sánchez Vázquez. 2002. El género *Pleurotus* y su capacidad para crecer en petróleo. *Terra* 20: 423-434.
- Ferrera, R., M. E. Lara Hernández y J. E. Sánchez Vázquez. 2007. El género *Pleurotus* y su capacidad para crecer en medios de cultivo y suelo con diferentes concentraciones de petróleo. Pp. 185-190. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp.* en México. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México, D.F.
- Flores, M., S. Torres y R. Téllez. 2004. Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. Pp. 72. Instituto Mexicano del Transporte, Secretaría de Comunicaciones y Transportes, Publicación Técnica no. 257, Sanfandila, Querétaro.
- García, V. A, J. Alonso y M. J. Melgar. 2005. *Agaricus macrosporus* as a potential bioremediation agent for substrates contaminated with heavy metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80: 325-330.
- Gil, Valdivia. G. y S. Chacón Domínguez. 2008. La crisis del petróleo en México. *Foro consultivo científico y tecnológico*. Disponible en:
http://www.foroconsultivo.org.mx/libros_editados/petroleo.pdf
- Gómez, J., M. Pazos, S. Rodríguez-Couto y M.A. Sanroman. 2005. Chestnut Shell and barley bran as potencial substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid state conditions. *Journal of Food Engineering* 68: 315-319.
- Gong, J., K., C. Chan y S. W. Chiu. 2006. Toxicities of DDE on Wheat and Bioremediation of DDE by Fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Human and Ecological Risk Assessment* 12: 221-235.
- Gramss, G., K.-D. Voigt y B. Kirsche. 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile y unsterile soils. *Biodegradation* 10: 51-62.
- Han, M.-J., H.-T. Choi y H.-G. Song. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *The Journal of Microbiology* 42: 94-98.
- Höök, M. 2009. Pemex Oil Output Declines at Fastest Rate Since World War II. ASPO: Association for the study of Peak Oil and Gas. Disponible en <http://www.peakoil.net/>.

- Hou, H., Zhou J., Wang J., Du C. y Yan B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*: 1415–1419.
- Hu, X., P. Wang, y H.-M. Hwang. 2009. Oxidation of anthracene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 100: 4963-4968.
- Ibbotson, B. G., D. M. Gorber, D. W. Reades, D. Smyth, I. Munro, R. F. Willes, M. G. Jones, G. C. Granville, H. J. Carte y C. E. Hailes. 1989. A site-specific approach for the development of soil cleanup guidelines for trace organic compounds. Pp. 328-330. *En: Petroleum Contaminated Soils*. Eds. P. T. Kosteki y E. J. Calabrese. Lewis Publishers. Chelsea MI.
- INEGI. 2006. El Petróleo en el Comercio internacional. http://cuentame.inegi.org.mx/economia/petroleo/exp_imp.aspx?tema=E.
- Jhadau, A., K. K. Vamsi, Y. Khairnar, A. Boraste y N. Gupta. 2009. Optimization of production and partial purification of laccase by *Phaerochaete chrysosporium* using submerged fermentation. *International Journal of Microbiology Research* 1: 9-12.
- Jiménez Cisneros, B. 2001. *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*. Pp. 641-680. Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, UNAM, México.
- Johannes, C. y A. Majcherczyk. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 524–528.
- Juteau, P., R. Larocque, D. Rho y A. LeDuy. 1999. Analisis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 863-868.
- Kajita, S., S. Sugawara, Y. Miyazaki, M. Nakamura, Y. Katayama, K. Shishido y Y. Iimura. 2004. Overproduction of recombinant laccase using a homologous expresión system in *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 194-199.
- Khammuang, S. y R. Sarnthima. 2007. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinula polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue R decolourisation. *Biotechnology* 6: 408-413.
- Kiyohara H., K. Nagao y K. Yana. 1982. Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates. *Applied Environmental Microbiology* 2: 454-457.

- Kilaru, S., P. J. Hoegger, A. Majcherczyk, C. Burns, K. Shishido, A. Bailey, G. D. Foster y U. Kües. 2006a. Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 200-210.
- Kilaru, S., P. J. Hoegger y U. Kües. 2006b. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* 50: 45-60.
- Kubátová, A., Erbanová P., Eichlerová I., Homolka L., Nerud F. y Sasek V. 2001. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* 43: 207-215.
- Kunamneni, A., A. Ballesteros, F. J. Plou y M. Alcalde. 2007. Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. A. Méndez-Vilas. Formatex. Madrid España.
- Lau, K. L., Y. Y. Tsang y S. W. Chiu. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate HAP-contaminated samples. *Chemosphere* 52: 1539-1546.
- Leonardi, V., V. Sasek, M. Petruccioli, A. D'Annibale, P. Erbanová y T. Cajthaml. 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of HAPs in aged industrial soils. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60: 165-170.
- Leonowicz, A., A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtas-Wasilewska, N.-S. Cho, M. Hofrichter y J. Rogalski. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Levin, M. y M. A. Gealt. 1997. Biodegradation of selected compounds. Pp. 120-135. *En: Biotreatment of Toxic and Dangerous Residues*. Eds. Levin M., M. A. Gealt. McGraw Hill. Interamericana, Madrid, España.
- Li, X., X. Lin, J. Zhang, Y. Wu, R. Yin, Y. Feng y Y. Wang. 2010 Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by crude extracts from spent mushroom substrate and its possible mechanisms. *Current Microbiology* 60:336-342.
- Liu, W., Y. Chao, S. Liu, H. Bao y S. Qian. 2003. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 174-181.

- Madzak, C., L. Otterbein, M. Chamkha, S. Moukha, M. Esther, C. Gaillardin y J.-M. Beckerich. 2005. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 5: 635-646.
- Majcherczyk, A., C. Johannes y A. Huttermann. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (HAP) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microbiology and Technology* 22: 335–341.
- Mancera-López, M. E., Esparza-García F., Chávez-Gómez B., Rodríguez-Vázquez R., Saucedo-Castañeda G. y Barrera-Cortés J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 61: 151-160.
- Manilla Pérez, E., H. M. Poggi Varaldo, B. Chávez Gómez, F. Esparza García y J. Barrera Cortés. 2004. Evaluación del funcionamiento de un tambor rotatorio aplicado a la biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos. *Interciencia* 29: 515-520.
- Manjunathan, J., M. Kumar, S. Jenefar y V. Kaviyarasan 2010. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula tuberregium* (fr) in liquid medium. *Journal of Biological Sciences*. 1: 88-93.
- Márquez-Araque, A. T., G. D. Mendoza Martínez, S. S. González Muñoz, S. E. Buntinx Dios y O. Loera Corral 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32: 780-785.
- Martínez-Carrera, D. 1998. Oyster mushrooms. Pp. 242-245. *En: McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology 1999*. Ed.: M. D. Licker. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional* 14: 61-74.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Pp. 209-224. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México, D.F.
- Martinez-Carrera, D. y L. López-Martínez. 2010. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. Pp. 513-554. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos*

- Comestibles y Medicinales en Latinoamerica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT -AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Mayett, Y. y D. Martínez-Carrera. 2010. El consumo de los hongos comestibles y su relevancia en la seguridad alimentaria de México. Pp. 293-332. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamerica: Avances y perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT -AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Miller, Tyler G. Jr. 2002. El agua, recursos y contaminación. Pp 333-370. *En: Introducción a la ciencia ambiental*. Eds. Miller Tyler G. Madrid, España.
- Mohammadi, A. y B. Nasernejad. 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials*. 161: 534-537.
- Mougin, C. 2002. Bioremediation and phytoremediation of industrial HAP-polluted soils. *Polycyclic Aromatic compounds* 22: 1011-1043.
- Murugesan, K., I.-H. Nam, Y.-M. Kim y Y.-S. Chang. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1662-1672.
- Novotny, C., P. Erbanova, V. Sasek, A. Kubatova, T. Cajtham, E. Lang, J. Krahl y F. Zadrazil. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and HAP removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 10: 159-168.
- Olguín, E. J., M. E. Hernandez, y G. Sánchez-Galva. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23: 139-154.
- Ortíz, O., I. Itze y A. Gavilán. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica (INE-SEMARNAT)* 69: 83-92.
- Palmieri, G., P. Giardina y C. Bianco. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 920-924.

- Papadopoulou, K., Rigas F. y Doulia D. 2006. Lindane degradation at soil by *Pleurotus ostreatus*. *Wseas transaction on environment and development*. 2: 489-496.
- Patel, H., A. Gupte y S. Gupte. 2009. Biodegradation of fluoranthene by basidiomycetes fungal isolate *Pleurotus Ostreatus* HP-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157: 367–376.
- Pemex. 2001. Derrames y fugas de hidrocarburos. *Seguridad, salud y medio ambiente*. Pp 18-19. Disponible en: http://www.pemex.com/files/content/dsi_01_12_derrames_fugas.pdf.
- Pemex. 2007. Las reservas de hidrocarburos de México. Pemex Exploración y Producción. Disponible en http://www.Pemex.com/files/content/Reservas_hidrocarburos_2007_full.pdf.
- Pemex. 2010. Informe 2009 de Responsabilidad Social. Junio 21, 2010. Pp. 2-3. Disponible en <http://www.Pemex.com.com/index.cfm?action=>
- Pérez-Armendáriz, B., O. Loera-Corral, L. Fernández-Linares, F. Esparza-García y R. Rodríguez-Vázquez. 2004. Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in Applied Microbiology* 38: 373-377.
- Pickard, M. A., R. Roman, R. Tinoco, R. y Vazquez-Duhalt. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3805–3809.
- Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
- Potin, O., C. Rafin y E. Veignie. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54:45–52.
- Pukahuta, C., P. Suwanarit, E. Shinagawa, H. Hoshida y Y. Nishizawa. 2004. Combination of laccase, xylanase and cellulase in lignocellulose degradation by white rot fungi, *Lentinula polychrous* Lev. and *L. squarrosulus* Mont. Kasetsart. *Journal of Natural Science* 38: 65–73.
- Quintero, J. C., T. A. Lu-Chau, M. T. Moreira, G. Feijoo y J. M. Lema. 2007. Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60: 319-326.
- Ramírez, N. E., M. C. Vargas, J. C. Ariza y C. Martínez. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología* V: 64-72.

- Rigas, F., K. Papadopoulou, V. Dritsa y D. Doulia. 2007. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing *Ganoderma australe* via response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials* 140:325–332.
- Rigas, F., R. Marchant, V. Dritsa, E. Kapsanaki-Gotsi, Z. Gonou-Zagou y E. J. Avramidesa. 2003. Screening of wood rotting fungi potentially useful for the degradation of organic pollutants. *Water, Air, and Soil Pollution* 3:201–210.
- Riser-Roberts, E. 1992. Indigenous microorganisms in biodegradation. Pp. 1-26, 27-34, 35-58, 59-65. *En: Bioremediation of petroleum contaminated sites*. Ed. C. K. Smoley. CRC Press. Boca Ratón.
- Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera, V. Volke, R. Rodríguez y L. Fernández. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20: 423-434.
- Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera-Cerrato, P. Sánchez-García, V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares y R. Rodríguez-Vázquez. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán (*Echinochloa polystachya*). *Agrociencia* 38: 1-12.
- Rodríguez-Vázquez, R., C. Montalvo, L. Dendooven, F. Esparza y L. Fernández. 1999. Degradation of benzo(a)pyrene in soil by white rot fungi, *in situ* and *on site* bioremediation. Pp 93-98. *En: Bioremediation Technologies for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds*. Eds. A. Leeson and B. C. Alleman. CRC Press, Boca Ratón.
- Rojas-Avelizapa, N. G., T. Roldán-Carrillo, H. Zegarra-Martínez, A. M. Muñoz-Colunga y L. C. Fernández-Linares. 2007. A field trial for an *ex-situ* bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere* 66: 1595-1600.
- Ruda de Schenquer, E. E. ; A. Mongiello, A. Acosta. 2004. *Contaminación y salud del suelo*. Ed. Universidad Nacional del Litoral, Secretaría de Extensión, Santa Fé. ISBN 987-508-244-9.
- Sauri-Riancho M. R. y E. R. Castillo-Borges. Utilización de la composta en procesos para la remoción de contaminantes. *Ingeniería Revista Académica Universidad de Yucatán* 2002. 6:55-60.
- SEMARNAT. 2007. Fuentes de contaminación en México. Instituto Nacional de Ecología. Periférico 5000, Col. Insurgentes Cuicuilco, C.P. 04530, Delegación Coyoacán, México

D.F. Última Actualización: 15/11/2007. Disponible en <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>.

- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta y D. Martínez-Carrera. 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Pp. 14. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds: J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- Song, 1999. Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 669-672.
- Tekere, M., R. Zvauya y J. S. Read, 2001. Ligninolytic enzyme production in selected subtropical white rot fungi under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology* 41: 115-129.
- Trejo-Hernández, M. R., A. López-Munguía y R. Quintero Ramírez. 2001. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymatic oxidation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 36: 635-639.
- Tsioulpas, A., D. Dimou, D. Iconomou y G. Aggelis. 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 84: 251-257.
- Tziialla, A. A., A. A. Taha, E. Kalogeris y H. Stamatis. 2009. Improving the catalytic performance of fungal laccases in monoterpene based reaction systems. *Biotechnology Letters* 31: 1451-1456.
- Um Y, M. W. Chang, y T. P. Holoman. 2010. A simple and effective plating method to screen polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria under various redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88:291-297.
- Unal, A. y N. Kolankaya. 2001. Dechlorination of bleached kraft pulp by laccase enzyme produced from some white rot fungi. *Turkish Journal of Biology* 25: 67-72.
- Valeriano, V. S., A. M. F. Silva, M. F. Santiago, M. T. F. Bara y A. G. Telma. 2009. Production of laccase by *Pynocorpus sanguineus* using 2,5-xylidine and etanol. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 790-794.
- Velasco, J. A. y T. L. Volke-Sepúlveda. 2003. El composteo: Una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica* 66: 41-53.

- Villee C. A. 1988. Los reinos protistas y de hongos. Pp 151-160. *En: Biología*. Eds. Villee C. A. Mc Graw Hill. México.
- Viswanath, B., M. S. Chandra, H. Pallavi y B. Rajasekhar-Reddy. 2008a. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. *African Journal of Biotechnology* 7: 1129-1133.
- Viswanath, B., M. S. Chandra, K. P. Kumar y B. Rajasekhar-Reddy. 2008b. Production and purification of laccase from *Stereum ostrea* and its ability to decolorize textile dyes. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 2: 19-25.
- Wade, L.G., Jr. 1993. Compuestos Aromáticos. Pp. 719-764. *En: Química Orgánica*. Ed. L. G. Wade. Prentice Hall. México.
- Walter, M., L. Boul, R. Chong y C. Ford. 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 71: 361–369.
- Zheng, Z. y J. P. Obbard. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. *Journal of Environmental Quality* 31: 1842–1847.
- Zobell, C. E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 10: 1-49.

ANEXO I

ACTIVIDAD DE LACASAS DE LAS DIFERENTES CEPAS DE HONGOS BASIDIOMICETOS EVALUADOS

A continuación se presentan los resultados de los análisis de actividad de lacasas obtenida de las cepas de hongos comestibles evaluadas en el capítulo I. Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo líquido EMB adicionado con Sulfato de cobre 0.1 mM, a temperatura ambiente (22°-26°C) con agitación. Se obtuvieron diariamente dos muestras de 500 µl del matraz A y dos del matraz B.

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-194 <i>Pleurotus</i> spp.					
	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D1	0.32	0.13	-0.02	0.02	0.11
D2	3.07	0.31	-0.42	0.09	0.76
D3	0.07	-0.09	0.33	0.35	0.16
D4	1.29	0.45	0.34	0.04	0.53
D5	14.14	16.37	20.99	14.86	16.59
D6	39.98	40.86	41.79	41.17	40.95
D7	40.48	42.98	34.72	54.41	43.15
D8	45.35	45.09	41.70	40.71	43.21
D9	30.46	33.14	27.15	27.83	29.65
D10	30.04	-	25.15	28.22	27.80
D11	22.17	19.79	28.19	26.20	24.09
D12	30.83	30.76	27.68	27.09	29.09
D13	27.19	27.00	23.32	26.42	25.98
D14	21.81	21.24	29.39	28.02	25.12
D15	22.12	21.48	17.94	18.56	20.03
D16	10.64	11.05	10.31	9.65	10.41

D17	12.71	13.85	14.87	13.85	13.82
D18	16.08	13.95	15.67	14.98	15.17
D19	13.27	12.85	12.63	13.36	13.03
D20	14.13	12.94	13.65	13.01	13.43
D21	14.73	14.57	14.36	14.79	14.61
D22	12.85	13.60	12.43	12.60	12.87
D23	13.84	14.01	13.06	12.70	13.40
D24	13.75	12.91	12.45	12.50	12.90
D25	11.94	14.66	12.25	13.35	13.05
D26	10.67	9.36	11.07	11.70	10.70
D27	11.41	10.30	9.75	9.83	10.32
D28	2.67	8.88	8.90	5.70	6.54
D29	10.70	9.41	7.18	5.61	8.22
D30	10.37	10.94	9.01	8.83	9.79

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-7 *Lentinula edodes*

	B1	B2	PROMEDIO
D1	0.28	1.07	0.67
D2	-	2.45	2.45
D3	0.67	2.54	1.60
D4	2.43	2.55	2.49
D5	1.93	1.92	1.93
D6	1.25	1.09	1.17
D7	9.79	10.33	10.06
D8	3.81	3.34	3.58
D9	3.59	3.97	3.78
D10	4.62	4.59	4.60

D11	2.90	2.75	2.83
D12	1.45	1.67	1.56
D13	26.56	14.32	20.44
D14	0.07	0.25	0.16
D15	0.34	0.12	0.23

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-205 *Ganoderma lucidum*

	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D1	-0.21	-0.20	-0.28	0.35	-0.09
D2	-0.53	-0.49	-0.40	-0.49	-0.48
D3	-0.40	-0.08	-1.09	-0.08	-0.41
D4	-0.03	-0.06	-0.03	-0.03	-0.04
D5	0.19	0.04	-0.05	-0.11	0.02
D6	0.16	-0.08	-0.04	0.17	0.05
D7	-0.14	-0.09	-0.19	0.04	-0.09
D8	-0.34	-0.38	-0.44	-0.42	-0.40
D9	-0.11	0.17	-0.16	-0.07	-0.04

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-30 *Pleurotus levis*

	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D1	4.47	6.26	9.34	8.27	7.08
D2	15.68	16.90	24.18	26.55	20.83
D3	46.56	48.59	41.00	53.38	47.38
D4	836.29	915.65	1030.45	858.96	910.34
D5	240.81	244.12	287.58	311.67	271.05

D6	-	334.82	348.05	297.97	326.95
D7	393.87	497.33	575.75	508.20	493.79
D8	439.70	665.04	558.39	-	554.37
D9	486.94	525.68	569.26	585.67	541.89
D10	529.93	594.65	640.12	614.96	594.91
D11	626.77	723.62	669.41	614.96	658.69
D12	733.28	662.67	668.09	810.28	718.58
D13	712.50	651.55	808.87	806.41	744.83
D14	757.37	763.99	764.36	831.92	779.41
D15	765.31	789.03	807.82	958.05	830.05
D16	447.47	659.11	963.82	996.41	766.70
D17	792.33	755.48	855.64	1057.83	865.32
D18	-	909.02	973.74	948.23	943.66
D19	923.66	923.66	1138.61	946.81	983.19
D20	633.15	745.11	846.21	498.98	680.86
D21	728.58	853.17	942.11	768.26	823.03
D22	527.45	-	536.90	664.92	576.42
D23	669.52	707.79	775.34	726.21	719.72
D24	514.93	-	578.35	607.05	566.78
D25	507.13	504.30	494.38	518.94	506.19
D26	741.33	657.24	785.74	1057.14	810.36
D27	767.31	832.03	1058.32	1030.92	922.15
D28	1213.74	849.99	1043.67	1177.37	1071.19
D29	1001.63	1034.23	1167.45	1099.89	1075.80

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-267 *Pleurotus pulmonarius*

	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D1	0.94	0.68	0.84	0.80	0.81
D2	17.69	21.25	18.91	16.97	18.71
D3	194.40	252.03	180.70	206.68	208.45
D4	2038.41	2328.48	890.93	-	1752.61
D5	2633.65	2877.89	1700.17	1786.15	2249.46
D6	2031.33	1922.20	1166.82	1131.86	1563.05
D7	-6.97	-10.51	436.63	481.65	225.20
D8	449.71	450.14	1612.10	1812.41	1081.09
D9	1643.95	1676.55	444.47	408.47	1043.36
D10	1697.81	1560.81	465.87	397.37	1030.46
D11	1633.56	1585.84	443.71	433.41	1024.13
D12	1423.57	1537.19	459.30	449.71	967.44
D13	635.63	598.31	200.54	246.83	420.33
D14	635.63	598.31	200.54	246.83	420.33
D15	726.80	757.51	299.74	217.55	500.40

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-98 *Pleurotus* sp.

	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D2	18.49	11.52	3.95	0.95	8.73
D3	-0.41	-0.26	-0.26	-0.24	-0.29
D4	31.85	27.16	32.41	31.62	30.76
D5	10.89	8.55	22.81	23.69	16.48
D6	31.23	18.17	10.23	9.34	17.24

D7	21.52	18.00	12.26	12.54	16.08
D8	-	-	13.97	16.65	15.31

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-253 *Pleurotus djamor*

	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D2	35.28	30.48	3.51	2.09	17.84
D3	39.14	33.01	35.22	32.59	34.99
D4	31.85	27.16	32.41	31.62	30.76
D5	27.89	25.86	25.29	26.96	26.50
D6	35.52	30.72	40.80	35.20	35.56
D7	30.77	32.58	-	-	31.67
D8	35.22	31.94	30.83	31.01	32.25

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-328 *Pleurotus pulmonarius*

	A1	A2	B1	B2
D1	35.28	30.48	3.51	2.09
D2	39.14	33.01	35.22	32.59
D3	31.85	27.16	32.41	31.62
D4	27.89	25.86	25.29	26.96
D5	35.52	30.72	40.80	35.20
D6	30.77	32.58	-	-
D7	35.22	31.94	30.83	31.01
D8	35.28	30.48	3.51	2.09
D9	39.14	33.01	35.22	32.59
D10	31.85	27.16	32.41	31.62

D11	27.89	25.86	25.29	26.96
D12	35.52	30.72	40.80	35.20
D13	30.77	32.58	-	-
D14	35.22	31.94	30.83	31.01
D15	35.28	30.48	3.51	2.09
D16	39.14	33.01	35.22	32.59
D17	31.85	27.16	32.41	31.62
D18	27.89	25.86	25.29	26.96
D19	35.52	30.72	40.80	35.20
D20	30.77	32.58	-	-
D21	35.22	31.94	30.83	31.01
D22	35.28	30.48	3.51	2.09
D23	39.14	33.01	35.22	32.59
D24	31.85	27.16	32.41	31.62
D25	27.89	25.86	25.29	26.96
D26	35.52	30.72	40.80	35.20
D27	30.77	32.58	-	-
D28	35.22	31.94	30.83	31.01
D29	35.28	30.48	3.51	2.09
D30	39.14	33.01	35.22	32.59

Actividad de lacasas U/ml cepa CP-50 *Pleurotus ostreatus*

	A1	A2	B1	B2	PROMEDIO
D2	11.05	8.60	6.88	6.83	8.34
D3	21.99	17.12	24.74	23.65	21.88

D4	18.11	12.85	9.89	6.59	11.86
D5	3557.49	3353.88	2092.07	2369.85	2843.32
D6	477.14	528.63	1582.11	978.36	891.56
D7	782.79	1394.56	1570.77	1295.35	1260.87
D8	3788.03	-	4265.16	3812.12	3955.11

ANEXO II

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS PRESENTADA POR LAS CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO

A continuación se presentan los resultados de los análisis estadísticos realizados para la actividad de lacasas obtenida de las cepas de hongos comestibles evaluadas en el capítulo I. Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo líquido EMB adicionado con Sulfato de cobre 0.1 mM, a temperatura ambiente (22°-26°C) con agitación. El control fue el medio de cultivo sin inocular. El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con tres repeticiones.

<i>CP-7 Lentinula edodes</i>						
Día	Diferencia significativa*	CP-7	Error estándar de CP-7	Control	Error estándar de control	
D1	B	0.67	0.39	0.04	0.03	
D2	A	2.45	0.08	0.02	0.03	
D3	A	1.60	0.93	0.17	0.09	
D4	A	2.49	0.06	0.14	0.15	
D5	A	1.93	0.00	0.50	0.15	
D6	A	1.17	0.08	0.06	0.09	
D7	A	10.06	0.27	0.16	0.19	
D8	A	3.58	0.23	-0.06	0.00	
D9	A	3.78	0.19	-0.02	0.02	
D10	A	4.60	0.02	-0.12	0.10	
D11	A	2.83	0.08	0.05	0.02	
D12	A	1.56	0.11	0.08	0.01	
D13	A	20.44	6.12	0.02	0.02	
D14	A	0.16	0.09	0.06	0.01	
D15	B	0.23	0.11	0.05	0.02	

*El control es "B"

CP-30 *Pleurotus levis*

Día	Diferencia significativa*	Error estándar		Error estándar	
		CP-30	de CP-30	Control	de control
D1	A	7.08	1.08	0.04	0.03
D2	A	20.83	2.67	0.02	0.03
D3	A	47.38	2.56	0.17	0.09
D4	A	910.34	43.38	0.14	0.15
D5	A	271.05	17.23	0.50	0.15
D6	A	326.95	14.98	0.06	0.09
D7	A	493.79	37.55	0.16	0.19
D8	A	554.37	65.08	-0.06	0.00
D9	A	541.89	22.26	-0.02	0.02
D10	A	594.91	23.57	-0.12	0.10
D11	A	658.69	24.60	0.05	0.02
D12	A	718.58	34.52	0.08	0.01
D13	A	744.83	38.34	0.02	0.02
D14	A	779.41	17.58	0.06	0.01
D15	A	830.05	43.54	0.05	0.02
D16	A	766.70	130.74	0.19	0.08
D17	A	865.32	67.42	0.11	0.17
D18	A	943.66	18.82	-0.72	0.06
D19	A	983.19	52.09	-0.72	0.06
D20	A	680.86	74.62	-0.37	0.01
D21	A	823.03	47.44	0.11	0.00
D22	A	576.42	44.33	-0.08	0.00
D23	A	719.72	21.98	0.23	0.01
D24	A	566.78	27.22	-0.05	0.02
D25	A	506.19	5.06	-0.20	0.01
D26	A	810.36	86.47	0.08	0.08

D27	A	922.15	72.15	0.08	0.01
D28	A	1071.19	82.30	0.09	0.01
D29	A	1075.80	36.75	0.06	0.01

*El control es "B"

CP-50 *Pleurotus ostreatus*

Día	Diferencia significativa*	CP-50	Error estándar de CP-7	Control	Error estándar de control
D1	A	8.34	0.99	0.02	0.03
D2	A	21.88	1.68	0.17	0.09
D3	A	11.86	2.44	0.14	0.15
D4	A	2843.32	360.47	0.50	0.15
D5	A	891.56	256.23	0.06	0.09
D6	A	1260.87	169.23	0.16	0.19
D7	A	3955.11	155.19	-0.06	0.00

*El control es "B"

CP-98 *Pleurotus sp.*

Día	Diferencia significativa*	CP-98	Error estándar de CP-98	Control	Error estándar de control
D2	B	8.73	3.94	0.02	0.03
D3	A	-0.29	0.04	0.17	0.09
D4	A	30.76	1.21	0.14	0.15
D5	B	16.48	3.94	0.50	0.15
D6	A	17.24	5.07	0.06	0.09
D7	A	16.08	2.24	0.16	0.19
D8	A	15.31	1.34	-0.06	0.00

*El control es "B"

CP-194 *Pleurotus* sp.

Día	Diferencia significativa*	Error estándar		Error estándar	
		CP-194	de CP-194	Control	de control
D1	B	0.11	0.08	0.04	0.03
D2	B	0.76	0.78	0.02	0.03
D3	B	0.16	0.11	0.17	0.09
D4	B	0.53	0.27	0.14	0.15
D5	A	16.59	1.54	0.50	0.15
D6	A	40.95	0.38	0.06	0.09
D7	A	43.15	4.13	0.16	0.19
D8	A	43.21	1.18	-0.06	0.00
D9	A	29.65	1.37	-0.02	0.02
D10	A	27.80	1.43	-0.12	0.10
D11	A	24.09	1.90	0.05	0.02
D12	A	29.09	0.99	0.08	0.01
D13	A	25.98	0.90	0.02	0.02
D14	A	25.12	2.09	0.06	0.01
D15	A	20.03	1.04	0.05	0.02
D16	A	10.41	0.30	0.19	0.08
D17	A	13.82	0.44	0.11	0.17
D18	A	15.17	0.46	-0.72	0.06
D19	A	13.03	0.17	-0.72	0.06
D20	A	13.43	0.28	-0.37	0.01
D21	A	14.61	0.10	0.11	0.00
D22	A	12.87	0.26	-0.08	0.00
D23	A	13.40	0.31	0.23	0.01
D24	A	12.90	0.30	-0.05	0.02
D25	A	13.05	0.62	-0.20	0.01
D26	A	10.70	0.49	0.08	0.08
D27	A	10.32	0.38	0.08	0.01

D28	A	6.54	1.49	0.09	0.01
D29	A	8.22	1.13	0.06	0.01
D30	A	9.79	0.52	-0.02	0.07

*El control es “B”

CP-205 *Ganoderma lucidum*

Día	Diferencia significativa*	Error estándar		Error estándar	
		CP-205	de CP-205	Control	de control
D1	B	-0.09	0.15	0.04	0.03
D2	A	-0.05	0.03	0.02	0.03
D3	B	-0.04	0.24	0.17	0.09
D4	B	-0.04	0.01	0.14	0.15
D5	B	0.02	0.07	0.50	0.15
D6	B	0.05	0.06	0.06	0.09
D7	B	-0.09	0.05	0.16	0.19
D8	A	0.02	0.02	-0.06	0.00
D9	B	0.07	0.07	-0.02	0.02

*El control es “B”

CP-253 *Pleurotus djamor*

Día	Diferencia significativa*	Error estándar		Error estándar	
		CP-253	de CP-253	Control	de control
D2	B	17.84	8.74	0.02	0.03
D3	A	34.99	1.50	0.17	0.09
D4	A	30.76	1.21	0.14	0.15
D5	A	26.50	0.58	0.50	0.15
D6	A	35.56	2.06	0.06	0.09
D7	A	31.67	0.90	0.16	0.19
D8	A	32.25	1.02	-0.06	0.00

*El control es “B”

CP-267 *Pleurotus pulmonarius*

Día	Diferencia significativa*	Error estándar		Error estándar	
		CP-267	de CP-267	Control	de control
D1	A	0.81	0.05	0.04	0.03
D2	A	18.71	0.94	0.02	0.03
D3	A	208.45	15.47	0.17	0.09
D4	A	1752.61	438.90	0.14	0.15
D5	A	2249.46	297.06	0.50	0.15
D6	A	1563.05	240.00	0.06	0.09
D7	B	225.20	135.38	0.16	0.19
D8	B	1081.09	366.69	-0.06	0.00
D9	B	1043.36	356.30	-0.02	0.02
D10	B	1030.46	347.15	-0.12	0.10
D11	B	1024.13	338.23	0.05	0.02
D12	A	967.44	297.06	0.08	0.01
D13	A	420.33	114.18	0.02	0.02
D14	A	420.33	114.18	0.06	0.01
D15	A	500.40	140.72	0.05	0.02

*El control es "B"

CP-328 *Pleurotus pulmonarius*

Día	Diferencia significativa*	Error estándar		Error estándar de	
		CP-328	de CP-328	Control	control
D1	B	0.04	0.02	0.04	0.03
D2	B	0.10	0.12	0.02	0.03
D3	B	0.00	0.18	0.17	0.09
D4	B	0.20	0.10	0.14	0.15
D5	B	-0.16	0.15	0.50	0.15
D6	A	3.30	1.20	0.06	0.09
D7	A	11.82	1.53	0.16	0.19
D8	A	24.33	4.29	-0.06	0.00

D9	A	10.85	1.21	-0.02	0.02
D10	A	22.30	2.75	-0.12	0.10
D11	A	25.99	4.51	0.05	0.02
D12	A	43.29	0.92	0.08	0.01
D13	A	51.01	2.08	0.02	0.02
D14	A	37.11	2.73	0.06	0.01
D15	A	40.00	2.22	0.05	0.02
D16	A	43.33	1.94	0.19	0.08
D17	A	50.03	2.21	0.11	0.17
D18	A	40.62	1.47	-0.72	0.06
D19	A	9.55	0.71	-0.72	0.06
D20	A	38.97	0.70	-0.37	0.01
D21	A	43.24	1.70	0.11	0.00
D22	A	40.11	1.24	-0.08	0.00
D23	A	43.81	0.72	0.23	0.01
D24	A	43.58	0.96	-0.05	0.02
D25	A	43.49	0.79	-0.20	0.01
D26	A	35.89	1.70	0.08	0.08
D27	A	40.69	2.48	0.08	0.01
D28	A	8.73	1.39	0.09	0.01
D29	A	30.39	0.86	0.06	0.01
D30	A	36.73	0.39	-0.02	0.07

*El control es "B"

ANEXO III

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS, ÁREA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS, PRESENTADA POR LAS CEPA CP-50 CRECIENDO EN PRESENCIA DE ANTRACENO

A continuación se presentan los resultados de los análisis estadísticos realizados para la actividad de lacasas obtenida, así como el área y la concentración de proteínas, de la cepa CP-50 evaluada en el capítulo II. CP-50 fue evaluada en medio de cultivo EMA a temperatura ambiente (22°-26°C) y en presencia de antraceno, en tres tiempos diferentes de su desarrollo. El control fue la cepa CP-50 crecida en ausencia de antraceno. El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza con la prueba de Tuckey para separación de medias, con un alfa = 0.05 y con cuatro repeticiones.

Actividad de lacasas medida con ABTS					
Días	Diferencia significativa*	TRATAMIENTO		CONTROL	
		MEDIA	Desviación estándar	MEDIA	Desviación estándar
0	B	-0.47	0.05	0.58	0.03
3	B	11.68	1.61	10.08	3.23
8	B	3.56	0.67	3.02	0.74
15	B	10.02	1.89	10.89	5.81

* El control es "B"

Actividad de lacasas medida con DMP					
Días	Diferencia significativa*	TRATAMIENTO		CONTROL	
		MEDIA	Desviación estándar	MEDIA	Desviación estándar
0	B	0.06	0.02	0.88	0.07
3	B	27.84	8.23	17.71	5.46
8	B	22.07	4.37	26.90	4.20

15	B	29.94	2.66	28.32	20.31
----	---	-------	------	-------	-------

* El control es “B”

Actividad de lacasas medida con Guayacol

Días	Diferencia significativa*	TRATAMIENTO		CONTROL	
		MEDIA	Desviación estándar	MEDIA	Desviación estándar
0	B	0.00	0.04	0.22	0.21
3	B	1.40	0.34	0.67	0.51
8	B	1.26	0.13	0.72	0.39
15	A	1.08	0.19	0.32	0.16

* El control es “B”

Actividad de lacasas medida con Syringaldazina

Días	Diferencia significativa*	TRATAMIENTO		CONTROL	
		MEDIA	Desviación estándar	MEDIA	Desviación estándar
0	B	0.30	0.10	1.29	0.17
3	B	28.06	5.03	15.89	8.61
8	B	25.21	3.60	25.21	3.60
15	A	20.15	1.33	15.05	1.06

* El control es “B”

ÁREA

Área micelial

Día	Diferencia significativa*	CP-50 con antraceno	Desviación estándar	Control	Desviación estándar
3	B	14.02	2.70	9.64	1.30
8	B	21.36	3.18	14.87	0.76
15	B	19.05	0.72	20.40	0.95

* El control es “B”

Concentración de proteína					
Día	Diferencia significativa*	CP-50 con antraceno	Desviación estándar	Control	Desviación estándar
3	B	12.25	1.14	11.66	0.43
8	B	15.12	0.21	13.95	0.33
15	B	14.24	0.46	13.51	0.81

* El control es "B"