



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

POTENCIAL ENZIMÁTICO DE *Pleurotus levis* PARA BIORREMIEDIAR SUELOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN MÉXICO

ZULMA BOLAÑOS GARCÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN

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 **Zulma Bolaños García**, 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 de la Profesora Consejera **Dra. Mercedes Sobal Cruz** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Potencial enzimático de *Pleurotus levis* para biorremediar suelos agrícolas contaminados por hidrocarburos del petróleo 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, la Consejera 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, 6 de marzo de 2015

Zulma Bolaños García

Dra. Mercedes Sobal Cruz
Vo. Bo. Profesora Consejera

La presente tesis, titulada: **Potencial enzimático de *Pleurotus levis* para biorremediar suelos agrícolas contaminados por hidrocarburos del petróleo en México**, realizada por la alumna: **Zulma Bolaños García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

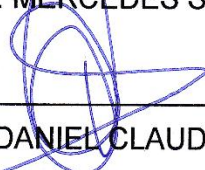
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



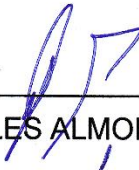
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



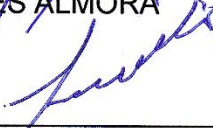
DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:



DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

ASESOR:



DR. BENJAMÍN VALERIANO PEÑA OLVERA

Puebla, Puebla, México, 6 de marzo de 2015

POTENCIAL ENZIMÁTICO DE *Pleurotus levis* PARA BIORREMEDIA SUELOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN MÉXICO

Zulma Bolaños García, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Al ser México un país productor de petróleo presenta un gran problema de contaminación por hidrocarburos poliaromáticos (HAPs), esta situación perjudica algunas zonas agrícolas en México. Los HAPs son altamente tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Una alternativa para solucionar este problema es la biorremediación utilizando hongos. Las especies del género *Pleurotus* presentan un sistema enzimático extracelular capaz de biodegradar y mineralizar compuestos xenobióticos, tales como los HAPs, entre ellos el antraceno. En la presente investigación se determinó el potencial enzimático de *P. levis* (CP-30) y de *P. ostreatus* (CP-754), como alternativa para biorremediar a futuro suelos agrícolas contaminados con HAPs. Se determinó la actividad enzimática de lacasas, manganeso peroxidasas (MnP) y lignino peroxidasas (LiP) en presencia de ácido acetil salicílico (AAS) y de antraceno. Se realizaron diseños experimentales completamente al azar, en donde se presentó un incremento en la actividad de lacasas y MnP al adicionar AAS. La mayor actividad de lacasas en presencia de AAS y 0.4 g de antraceno fue en *P. levis* (CP-30) con 42.005 U mL⁻¹, y en *P. ostreatus* (CP-754) con 12.487 U mL⁻¹; la mayor actividad de MnP se presentó en *P. levis* (CP-30) con 0.216 U L⁻¹ y en *P. ostreatus* (CP-754) con 0.388 U L⁻¹. *P. levis* (CP-30) presentó una mayor actividad de lacasas, mientras que *P. ostreatus* (CP-754) una actividad de MnP similar a *P. levis* (CP-30) en presencia de antraceno. Se presenta una estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos empleando cepas nativas de *P. levis*.

Palabras claves: Antraceno, biorremediación, biotecnología, enzimas, hongos comestibles, *Pleurotus*.

ENZYMATIC POTENTIAL OF *Pleurotus levis* FOR BIOREMEDIATE
CONTAMINATED BY PETROLEUM HYDROCARBONS IN MEXICO
AGRICULTURAL SOILS

Zulma Bolaños García, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

As a oil producer Mexico presents a big problem of contamination by polyaromatic hydrocarbons (PAHs), this situation harms some agricultural areas in Mexico. PAHs are highly toxic, mutagenic and carcinogenic compounds. An alternative to solve this problem is bioremediation using fungi mushrooms. *Pleurotus* fungi exhibit an extracellular enzymatic system capable of biodegrading and mineralize xenobiotic compounds PAHs such as anthracene. In the present research project the enzymatic potential of *P. levis* (CP-30) and *P. ostreatus* (CP-754) as an alternative to bioremediate agricultural soils contaminated with PAHs were determined. The laccases, manganese peroxidases (MnP) and lignin peroxidases (LiP) activity in the presence of acetylsalicylic acid (ASA) and anthracene were analyzed. In a completely randomized experimental design, an increase in the laccase and MnP activity by adding AAS was observed. Greater laccase activity in the presence of ASA and 0.4 g of anthracene in *P. levis* (CP-30) 42.005 U mL⁻¹, and *P. ostreatus* (CP-754) 12.487 U mL⁻¹ was observed; the most MnP activity of in *P. levis* (CP-30) with 0.216 U L⁻¹ and *P. ostreatus* (CP-754) with 0.388 U L⁻¹ was produced. This paper *P. levis* (CP-30) had a higher laccase activity and *P. ostreatus* (CP-754) MnP activity like that *P. levis* (CP-30) in the presence of anthracene, this represents an alternative to remediate agricultural soils contaminated with hydrocarbons with native strains of *P. levis*.

Key words: Anthracene, bioremediation, biotechnology, edible mushrooms, enzymes, *Pleurotus*.

Agradecimientos

Al pueblo de México a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haber financiado mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla durante el período 2013-2014.

A mi familia, por estar conmigo en todo momento, por su amor y apoyo incondicional aún en la distancia.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, por brindarme parte de los insumos que utilicé durante la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por permitirme realizar una estancia de investigación y aprender en el laboratorio de Xenobióticos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN-Zacatenco).

A mi consejo particular integrado por la Dra. Mercedes Sobal Cruz, el Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, el Dr. Porfirio Morales Almora y el Dr. Benjamín Valeriano Peña Olvera, por sus valiosas y oportunas observaciones y sobre todo por sus consejos para crecer como futura investigadora.

A la M.C. Myrna Bonilla Quintero, al Biól. Wilfrido Martínez Sánchez, y al M.C. Alan Helios Escudero Uribe por sus consejos, amistad y apoyo durante mi estancia de investigación, así como a todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles.

A mis compañeros del laboratorio de Xenobióticos: el Dr. Wilberth Chan Cupul, el M. C. Roberto Zúñiga Silva y el M. C. Alejandro Islas García por su amistad y por compartir sus conocimientos y experiencia.

A mis compañeros del Colegio de Postgraduados: Samuel A. Torres Méndez, Alfonso Rosado Espinoza de los Monteros, Apolo Gilmar Redón Hernández y Vladimir Mitzi Dávila.

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL.....	3
2.1. Hidrocarburos poliaromáticos derivados del petróleo	3
2.2. Contaminación de suelos agrícolas en México por HAPs derivados del petróleo	4
2.3. Biorremediación	7
2.4. Los hongos como biorremediadores	8
2.5. Actividad enzimática de los hongos	10
2.5.1. Lacasas	10
2.5.2. Manganeseo peroxidasas.....	11
2.5.3. Lignino peroxidasas	12
2.5.4. Celulasas	13
2.6. Genes que codifican para enzimas ligninolíticas de <i>Pleurotus</i>	13
2.7. El género <i>Pleurotus</i> en la biorremediación	15
2.7.1. <i>P. levis</i> en la biorremediación	15
2.8. Propiedades del ácido acetil salicílico (AAS)	16
2.9. Biotecnología y desarrollo	16
2.10. Biotecnología de hongos comestibles.....	18
2.11. Importancia de los hongos comestibles	19
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. OBJETIVO GENERAL	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Determinación de pH	24
6.2. Medición del área de la colonia (cm ²) y velocidad de crecimiento micelial (cm día ⁻¹).....	24
6.3. Determinación del contenido de proteínas (µg mL ⁻¹)	24
6.4. Determinación de la actividad de lacasas en microplaca (U mL ⁻¹).....	25
6.5. Determinación de la actividad de manganeseo peroxidasas (U L ⁻¹) en microplaca.....	27
6.7. Determinación de la actividad de lignino peroxidasas (U L ⁻¹) en celda	28
6.8. Determinación de la actividad de celulasas (g L ⁻¹) en microplaca.....	29
6.9. Análisis estadístico.....	30
VII. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ENZIMÁTICO DE <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) COMO CEPA DE REFERENCIA	31
7.1. Resumen.....	31
7.2. Objetivos específicos	31
7.3. Materiales y Métodos	32
7.3.1. Reactivación de <i>P. ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo EMA	32
7.3.2. Preparación de los medios de cultivo	32
7.3.3. Cinética con inóculo convencional.....	33
7.3.4. Variables estudiadas.....	33
7.3.5. Fisiología y enzimas de <i>P. ostreatus</i> (CP-754).....	33
7.3.5.1. Testigo 1 (EMA).....	33
7.3.5.2. Tratamiento 1 (EMA+AAS 100 µM)	34

7.3.5.3. Toma de muestras durante la cinética.....	35
7.3.5.4. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras.....	35
7.3.5.5. Tratamiento 2 (EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno)	36
7.3.5.6. Toma de muestra en base al crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en presencia de antraceno	37
7.3.5.7. Obtención y conservación del sobrenadante de la muestra	38
7.4. Resultados	40
7.4.1. Testigo 1 versus Tratamiento 1	40
7.4.1.1. pH.....	40
7.4.1.2. Actividad de lacasas	41
7.4.1.3. Actividad de manganeso peroxidasas	42
7.4.1.4. Actividad de lignino peroxidasas	44
7.4.2. Tratamiento 1 versus Tratamiento 2	46
7.4.2.1. Área y velocidad de crecimiento	47
7.4.2.2. pH.....	48
7.4.2.3. Actividad de lacasas	50
7.4.2.4. Actividad de manganeso peroxidasas	51
7.4.2.5. Actividad de lignino peroxidasas	53
7.5. Discusión	55
7.6. Conclusiones y perspectivas.....	57
VIII. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ENZIMÁTICO DE <i>Pleurotus levis</i> (CP-30).....	58
8.1. Resumen.....	58
8.2. Objetivos específicos	58
8.3. Materiales y Métodos	59
8.3.1. Reactivación de <i>P. levis</i> (CP-30) en medio de cultivo PDA	59
8.3.2. Preparación de los medios de cultivo	59
8.3.3. Cinética de crecimiento.....	60
8.3.3.1. Inóculo homogeneizado.....	60
8.3.3.2. Inóculo convencional	61
8.3.4. Variables estudiadas.....	62
8.3.5. Fisiología y enzimas de <i>P. levis</i> (CP-30)	63
8.3.5.1. Testigo 1 (EMA con inóculo convencional).....	63
8.3.5.2. Testigo 2 (EMA con inóculo homogeneizado)	64
8.3.5.3. Testigo 3 (PDA con inóculo convencional)	64
8.3.5.4. Testigo 4 (PDA con inóculo homogeneizado).....	64
8.3.5.5. Tratamiento 1 (EMA+AAS 1 μ M con inóculo convencional)	64
8.3.5.6. Tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado)...	64
8.3.5.7. Tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M con inóculo convencional)	65
8.3.5.8. Tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μ M con inóculo homogeneizado).....	65
8.3.5.9. Tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M con inóculo convencional).....	65
8.3.5.10. Tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado) .	65
8.3.5.11. Tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M con inóculo convencional).....	65
8.3.5.12. Tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μ M con inóculo homogeneizado)	65
8.3.5.13. Toma de muestras durante las cinéticas	66
8.3.5.14. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras.....	66

8.3.5.15. Tratamiento 10 (PDA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado+0.4 g de antraceno).....	66
8.3.5.16. Toma de muestra en base al crecimiento de <i>P. levis</i> en presencia de antraceno	68
8.3.5.17. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras.....	68
8.3.5.18. Tratamiento 11 (PDA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado+0.4 g de antraceno colocado sobre la colonia).....	69
8.3.5.19. Toma de muestra dependiendo del crecimiento de la colonia en el tratamiento 11	70
8.3.5.20. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras para el tratamiento 11	70
8.4. Resultados	71
8.4.1. Caracterización micelial y enzimática de <i>P. levis</i> (CP-30) en los medios de cultivo EMA y PDA adicionado con AAS 1 μ M y 100 μ M usando inóculo convencional y homogeneizado	71
8.4.1.1. Área de la colonia y velocidad de crecimiento	73
8.4.1.2. pH.....	75
8.4.1.3. Contenido de proteínas	78
8.4.1.4. Actividad de lacasas	80
8.4.1.5. Actividad de celulasas	83
8.4.2. Determinación del potencial enzimático de <i>P. levis</i> (CP-30) en presencia de AAS 100 μ M y de 0.4 g antraceno.....	85
8.4.2.1. pH.....	86
8.4.2.2. Actividad de lacasas	87
8.4.2.3. Actividad de manganeso peroxidasas	89
8.4.3. Tratamiento 7 y 11	91
8.4.3.1. Actividad de lacasas	91
8.4.3.2. Actividad de manganeso peroxidasas	93
8.5. Discusión	95
8.6. Conclusiones y perspectivas.....	98
IX. CONCLUSIONES GENERALES	99
X. PROPUESTA DE ESTRATEGIA PARA BIORREMEDIAN SUELOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO <i>P. levis</i>	100
10.1. Introducción.....	100
10.2. Actores sociales	102
10.3. Objetivos estratégicos y específicos	104
XI. LITERATURA CITADA.....	105
XII. ANEXOS	111

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales componentes del petróleo (Botello, 2005).....	3
Figura 2. Afectaciones por petróleo, enero-marzo 2014. Fuente: Dirección Corporativa de Operaciones PEMEX 2014.....	6
Figura 3. Derrames y fugas 2000-2014. Primer semestre 2014. Cifras redondeadas. Corresponden a las fugas y derrames derivados de la operación de PEMEX Exploración y Producción, subsidiaria regulada por la CNH. Fuente: PROFEPA 2014.....	6
Figura 4. Determinación de proteínas por el método de Bradford en microplaca.....	25
Figura 5. Determinación de la actividad de lacasas por el método de Bourbonnais <i>et al.</i> (1998) en microplaca.....	26
Figura 6. Determinación de la actividad de manganeso peroxidasa por el método de Mathieu <i>et al.</i> (2013) en microplaca.....	27
Figura 7. Determinación de la actividad de lignino peroxidasa por el método de Tien y Kirk (1989) en celda.	28
Figura 8. Determinación de la actividad de celulasas por el método de Wood <i>et al.</i> (2012) en microplaca.....	30
Figura 9. Inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA.....	32
Figura 10. Caracterización enzimática de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en presencia de AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y con EMA (Testigo) en comparación con el blanco.....	34
Figura 11. Método para la obtención del sobrenadante de las muestras.....	35
Figura 12. Determinación de la actividad enzimática de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en presencia de AAS 100 μ M y 0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).....	36
Figura 13. Toma de muestras en base al crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1), EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2), EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno sin inóculo (Blanco). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno.....	38
Figura 14. pH de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1).....	41
Figura 15. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	42
Figura 16. Actividad de MnP de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	44

Figura 17	. Actividad de LiP de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	45
Figura 18.	Crecimiento de la colonia de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno.....	46
Figura 19.	Área de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2) (n=3).....	47
Figura 20.	Velocidad de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2) (n=3).....	48
Figura 21.	pH de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC= Colonización completa de la colonia (n=3).....	49
Figura 22.	Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).....	51
Figura 23.	Actividad de MnP de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).....	52
Figura 24.	Actividad de LiP de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).....	54

Figura 25. Inóculo de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA. (a=inóculo convencional, b=inóculo homogeneizado)	59
Figura 26. Inoculación de los medios EMA y PDA con inóculo convencional y homogeneizado de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30).....	62
Figura 27. Descripción de los tratamientos 7 y 10 propuestos para determinar la actividad enzimática de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en cultivo semisólido PDA en presencia de AAS 100 μ M y 0.4 g de antraceno, utilizando inóculo homogeneizado.....	67
Figura 28. Diagrama de flujo del tratamiento 7 y 11 para determinar la actividad enzimática de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en cultivo semisólido PDA en presencia de AAS 100 μ M y 0.4 g de antraceno, utilizando inóculo homogeneizado a los 30 días de incubación.....	69
Figura 29. Crecimiento de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1).usando inóculo convencional después de 35 días de incubación.....	72
Figura 30. Crecimiento de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medios de cultivo PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) usando inóculo homogeneizado después de 15 días de incubación.....	73
Figura 31. Área de crecimiento de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1), PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6) a los 35 días de incubación (n=3).....	74
Figura 32. Velocidad de crecimiento de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1), PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6) (n=3).....	75
Figura 33. pH de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).....	77
Figura 34. pH de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	78

Figura 35. Contenido de proteínas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).....	79
Figura 36. Contenido de proteínas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	80
Figura 37. Actividad de lacasas <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).....	82
Figura 38. Actividad de lacasas <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	84
Figura 39. Actividad de celulasas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).....	84
Figura 40. Actividad de celulasas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).....	85
Figura 41. Crecimiento de la colonia de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno.....	86
Figura 42. pH de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).....	87

Figura 43. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).....	89
Figura 44. Actividad de MnP de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).....	90
Figura 45. Crecimiento de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11).....	91
Figura 46. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 11) (n=3).....	93
Figura 47. Actividad de MnP de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno distribuido sobre la colonia desarrollada después de 30 días (Tratamiento 10) (n=3).....	94
Figura 48. Actores principales de la problemática de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos.....	103

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Descripción de la manera que se definieron las condiciones del experimento, la siembra y los tratamientos para la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754).....	33
Cuadro 2. Variables analizadas en cada muestra.....	34
Cuadro 3. pH de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (testigo 1) y con AAS 100 μM (tratamiento 1)....	40
Cuadro 4. Actividad de lacasas (U mL^{-1}) de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y con AAS 100 μM (Tratamiento 1).....	41
Cuadro 5. Actividad de MnP (U L^{-1}) de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1).....	43
Cuadro 6. Actividad de LiP (U L^{-1}) de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1).....	44
Cuadro 7. pH de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).....	49
Cuadro 8. Actividad de lacasas (U mL^{-1}) de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).....	50
Cuadro 9. Actividad de MnP (U L^{-1}) de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).....	51
Cuadro 10. Actividad de LiP de (U L^{-1}) de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).....	53
Cuadro 11. Descripción de la manera que se definieron las condiciones del experimento, la siembra y los tratamientos para la cepa de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30).....	60
Cuadro 12. Variables analizadas en cada muestra.....	63
Cuadro 13. pH de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA y EMA en presencia de AAS 1 μM y 100 μM usando inóculo homogeneizado y convencional.....	76
Cuadro 14. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA y EMA en presencia de AAS 1 μM y 100 μM usando inóculo homogeneizado y convencional.....	81
Cuadro 15. pH de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 10).....	86
Cuadro 16. Actividad de lacasas (U mL^{-1}) de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 10).....	88

Cuadro 17.	Actividad de MnP (U L ⁻¹) de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10).....	89
Cuadro 18.	Actividad de lacasas (U mL ⁻¹) de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11) (n=3).....	92
Cuadro 19.	Actividad enzimática de MnP (U L ⁻¹) de <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11) (n=3).....	94
Cuadro 20.	Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas.....	101
Cuadro 21.	Asignación de objetivos de la estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.....	104

I. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) son un grupo de contaminantes peligrosos ampliamente distribuidos en el ambiente que pueden persistir por largos períodos de tiempo. Muchos de los HAPs son altamente tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Al ser México un país productor de petróleo presenta un gran problema de contaminación, esta situación perjudica algunas zonas agrícolas en México (Gómez, 2009).

Los suelos contaminados con petróleo o sus derivados provenientes de refinerías, petroquímicas, terminales, estaciones de servicio, tanques de combustible, accidentes y del procesamiento industrial del petróleo, son fuentes primarias de la contaminación. Los HAPs son una clase de compuestos peligrosos muy notorios, los cuales se encuentran en la gasolina, el diésel, el petróleo, así como en el alquitrán de hulla y sus derivados (polifenoles), son contaminantes industriales comunes, y se encuentran como co-contaminantes en el medio ambiente. Son compuestos orgánicos hidrófobos compuestos de dos o más anillos de benceno fusionados en una sola estructura aromática. Ellos se pueden formar naturalmente de la quema de la materia orgánica o de la producción y la combustión parcial de combustibles fósiles o de compuestos alicíclicos complejos, son de los componentes más ambientalmente persistentes de los derrames de petróleo (SurrIDGE *et al.*, 2009).

Una alternativa para solucionar éste problema es la biorremediación mediante hongos o denominada micorremediación, que es el proceso de utilización de los hongos para devolver un ambiente contaminado a un estado menos contaminado o sin contaminación. Pueden aplicarse en suelos contaminados por los derrames de petróleo, productos químicos industriales, aguas superficiales contaminadas, así como en los suelos agrícolas (Sepehri *et al.*, 2013).

Los hongos de la podredumbre blanca dentro de los cuales se encuentra el género *Pleurotus*, presentan un sistema enzimático extracelular capaz de biodegradar y mineralizar compuestos xenobióticos tales como los hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) entre ellos el antraceno. El mecanismo por el cual llevan a cabo la degradación incluye la producción de enzimas ligninolíticas principalmente lacasas, manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa, la inespecificidad química y la intensa actividad

oxidante de estas enzimas les otorga la capacidad de biodegradar contaminantes con una estructura similar a las unidades monoméricas que constituyen la lignina, llevando a estos contaminantes a un estado final de CO₂ y H₂O, ofreciendo un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamientos de contaminantes.

En el presente proyecto de investigación se planteó determinar el potencial enzimático de *Pleurotus*, utilizando a *P. ostreatus* como referencia y a *P. levis* como recurso genético nativo para biorremediar suelos agrícolas, determinando la actividad de lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas en presencia de ácido acético salicílico y de antraceno.

II. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Hidrocarburos poliaromáticos derivados del petróleo

Los principales componentes del petróleo son los hidrocarburos, los cuales representan del 50–98% de su composición total (Figura 1), están formados por alcanos, cicloalcanos y compuestos poliaromáticos (Botello, 2005).

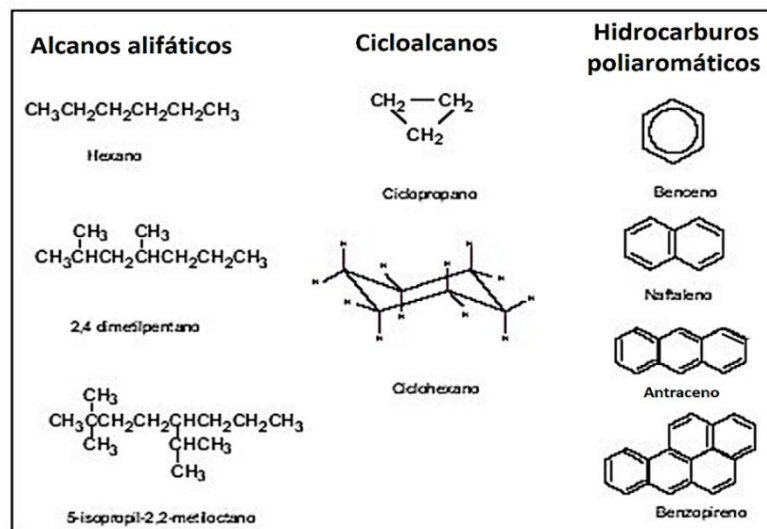


Figura 1. Principales componentes del petróleo (Botello, 2005).

Los hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) son compuestos de dos o más anillos aromáticos condensados de átomos de carbono e hidrogeno, los anillos están unidos entre sí en arreglos lineales y angulares. Debido a su energía de resonancia negativa, son químicamente estables a temperatura ambiente, y debido a su estructura hidrofóbicas, son casi o totalmente insolubles en agua y altamente lipofílicos (Cerniglia y Sutherland, 2010).

Son un grupo de contaminantes peligrosos ampliamente distribuidos en el ambiente, que pueden persistir por largos periodos de tiempo. Muchos de los HAPs son altamente tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Los suelos contaminados con petróleo o sus derivados provenientes de refinerías, petroquímicas, terminales, estaciones de servicio, tanques de combustible, accidentes y el procesamiento industrial del petróleo, son fuentes primarias de la contaminación por HAPs (Gómez, 2009). Los suelos a lo largo de los márgenes de la carretera están contaminados por

HAPs de los combustibles de motor, escape, alquitrán y polvo de la calle, los cuales pueden unirse a la materia orgánica, limo y otras partículas pequeñas de textura en la capa superior del suelo, o pueden adsorber a la materia orgánica disuelta y filtrarse al subsuelo (Cerniglia y Sutherland, 2010).

Algunos HAPs de bajo peso molecular son muy tóxicos para los organismos acuáticos; además, algunos HAPs de alto peso molecular son mutagénicos para las bacterias y teratogénicos o carcinogénico para los mamíferos. Debido a sus características de toxicidad, representan un riesgo para la salud humana y la vida silvestre. Esta condición reta a nuestra sociedad para buscar medidas efectivas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico (Valderrama y Téllez, 2000).

Aunque algunos HAPs de bajo peso molecular, tales como el antraceno, no son cancerígenos, sus mecanismos de oxidación son de considerable interés, ya que presentan las mismas disposiciones de los anillos aromáticos condensados que se encuentran en las estructuras más complejas de los HAPs que son cancerígenos, tales como benzo [a] pireno y el benzo [a] antraceno (Collins *et al.*, 1996).

2.2. Contaminación de suelos agrícolas en México por HAPs derivados del petróleo

En México, existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo debido principalmente a derrames, así como a las actividades propias de la industria petrolera. Este tipo de compuestos se acumulan en ecosistemas marinos y en suelos, siendo responsables de su deterioro. Algunos suelos contaminados principalmente en el sureste de México, contienen concentraciones de hidrocarburos hasta de 450,000 mg/kg (Volke y Velazco, 2003).

Los derrames por petróleo han afectado miles de hectáreas productivas en zonas rurales y a familias productoras de escasos recursos ubicadas en espacios marginados. Cuando los hidrocarburos penetran los suelos de cultivo, estos se compactan, modifican el pH original y sobretodo eliminan por sus efectos tóxicos la biota del sistema, reduciendo la fertilidad de los suelos (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2011).

Los hidrocarburos son acumulados en el suelo, y algunos otros pueden llegar a los mantos freáticos y formar capas en formas de nata, fragmentan los agregados del

suelo, modifican su estructura y disminuyen la capacidad del suelo para retener agua disponible para las plantas, y como consecuencia de su composición química, modifican la relación carbono nitrógeno (C/N) propiciando la inmovilización de N y mayor liberación de CO₂ a la atmósfera (Díaz, 2012).

De acuerdo con datos publicados por el INEGI la superficie de suelo degradado por causas de contaminación en 1999 fue de 25,967 km² (Volke y Velazco, 2002). Esta degradación ha ocurrido por diversos motivos entre los que se encuentran varios siglos de actividad minera y también varias décadas de actividades de la industria petroquímica y de refinación del petróleo.

La suma de fugas y derrames de hidrocarburos registrada en 2001 representa el 0.6% de las emisiones y 4 descargas totales de PEMEX. El 75% de este volumen fue consecuencia de 73 eventos en instalaciones de PEMEX Refinería (PR) y el restante se debió a los 1,169 ocurridos en instalaciones de PEMEX Exploración y Producción (PEP). Prácticamente todo el volumen derramado por PR se registró en los cuatro sectores de ductos del país, con una incidencia de 48% en el Sector Sureste. En el caso de PEP, 97% del volumen se derramó en instalaciones en tierra.

El número de fugas registradas estadísticamente (mayores a 1 barril) en el año 2013 fue de 88, cifra menor en 46% a las registradas en el año anterior. Las principales causas identificadas se originaron por: 34 por corrosión interior, 16 por falla de material, 13 por actos vandálicos, 12 por corrosión exterior y 13 por otras causas. El 85% de las fugas en ductos e instalaciones registradas en el periodo de referencia, se concentraron en los Activos Integrales Aceite Terciario del Golfo (27%) y Burgos (3%), en los Activos de Producción Poza Rica-Altamira (32%) y Bellota Jujo (6%) y la Gerencia de Transporte y Distribución de Hidrocarburos Sur (17%). El volumen derramado se estimó en 11 mil 936 barriles de hidrocarburos sin incluir agua, lo que representó un aumento con respecto al año anterior de 229.5% (PEMEX, 2013).

En el primer trimestre de 2014 (Figura 2) se registró un volumen derramado de producto (líquidos) 464% mayor, a consecuencia de un derrame de 1,069 barriles de crudo que se registró en el último segmento del oleoducto Nuevo Teapa-Salina Cruz. De los 16 eventos registrados en PEP, 13 han sido ductos de recolección y tres en ductos de transporte (PEMEX, 2014).

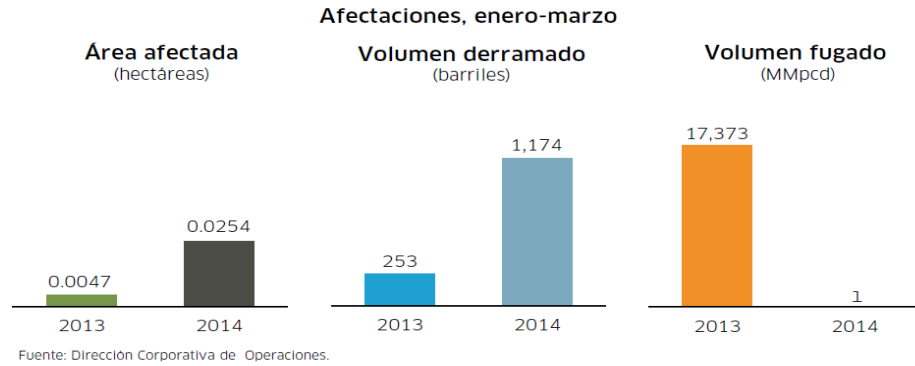


Figura 2. Afectaciones por petróleo, enero-marzo 2014. Fuente: Dirección Corporativa de Operaciones PEMEX 2014.

Al final del primer trimestre de 2014, se registró un inventario acumulado de 1,023.01 hectáreas de sitios contaminados (Figura 3), que representa un aumento de 0.3% respecto al inventario final de 2013 (1,020.24 hectáreas), como resultado de que la incorporación de nuevas áreas afectadas fue superior a las áreas remediadas (PEMEX, 2014).

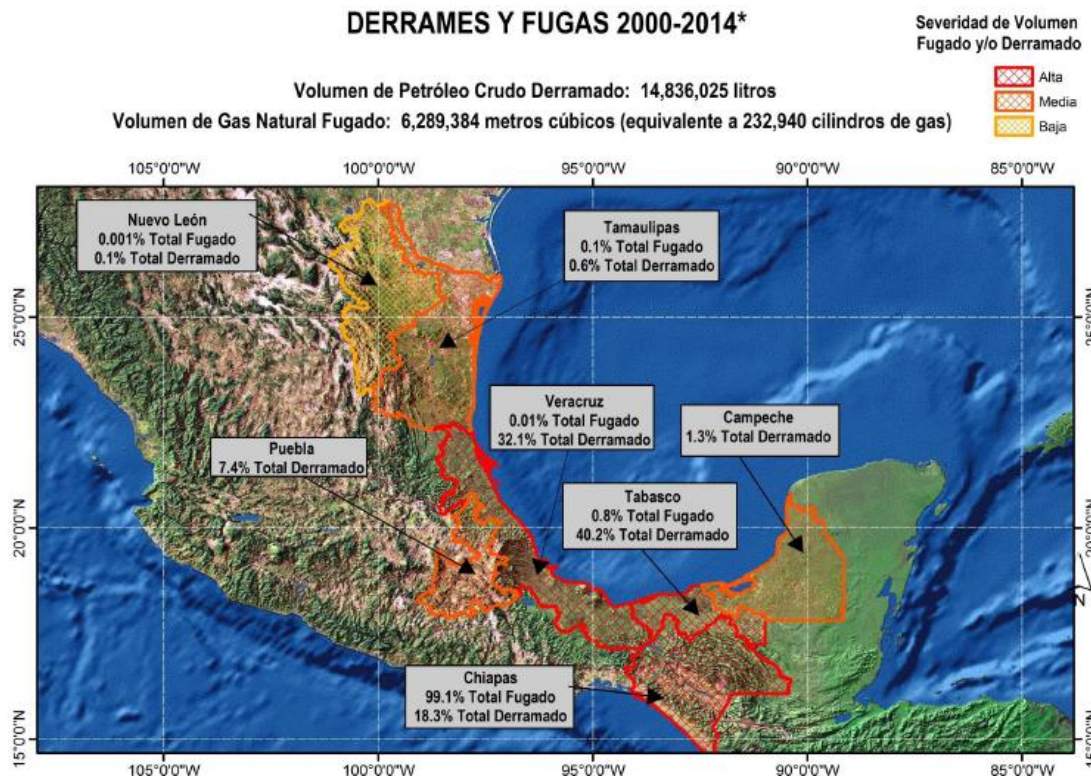


Figura 3. Derrames y fugas 2000-2014. Primer semestre 2014. Cifras redondeadas. Corresponden a las fugas y derrames derivados de la operación de PEMEX Exploración y Producción, subsidiaria regulada por la CNH. Fuente: PROFEPA 2014.

2.3. Biorremediación

La biorremediación es el uso de seres vivos para degradar contaminantes a productos menos tóxicos, como ácidos orgánicos, aldehídos, dióxido de carbono y agua. El principal propósito de la biorremediación es eliminar los contaminantes del entorno evitando perturbar el ecosistema lo menos posible (Mancera *et al.*, 2008). También reducir los contaminantes a niveles indetectables, no tóxicos, o aceptables, los contaminantes se eliminan por absorción o transformación en una forma menos tóxica (Korcan *et al.*, 2013).

En comparación con las técnicas de remediación física o química, la biorremediación es de gran interés por ser una técnica de rehabilitación sostenible de los sitios contaminados, sin modificar fuertemente las propiedades del suelo. Las técnicas de biorremediación están destinadas principalmente para los sitios donde no hay urgencia para la rehabilitación, y donde los métodos tradicionales de descontaminación no se adaptan o son ineficaces. La biorremediación puede ir acompañada de la atenuación natural mejorada, en la que involucra la estimulación de las facultades de los ecosistemas para evolucionar y para regenerarse. Permiten también en la mayoría de los casos, la posterior reutilización de los suelos limpios (Mougin *et al.*, 2009).

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. El mecanismo por el cual lleva a cabo la degradación de los compuestos orgánicos, incluye la producción de enzimas (principalmente lacasas y manganeso peroxidasas) y la participación en procesos metabólicos con transferencia de electrones desde un electrón donador hasta un compuesto aceptor de electrones. Los métodos para biorremediar sólidos contaminados pueden ser *in situ*, *ex situ*, y *on site*, por bioestimulación y bioaumentación, con lisímetros, en biopilas, en cultivo sólido, aplicando nutrientes y residuos agroindustriales (Rodríguez-Vázquez, 2012).

Aunque existen muchos procesos de biorremediación diferentes, hay factores comunes que son vitales en todos los procesos de biorremediación. Todos los sistemas de biorremediación consisten en dos cosas importantes: las entradas y

salidas. Las entradas incluyen contaminantes orgánicos y las condiciones operativas, que se componen de todas las condiciones ambientales y otros factores tales como la toxicidad, biodisponibilidad, y la tasa de degradación de los contaminantes, las salidas incluyen los compuestos resultantes de la degradación ya sean metabolitos o CO₂ y H₂O (Korcan *et al.*, 2013).

2.4. Los hongos como biorremediadores

La micorremediación es una forma de biorremediación, que se refiere más ampliamente a degradar o eliminar sustancias tóxicas orgánicas e inorgánicas en el medio ambiente utilizando los procesos biológicos de los hongos. El término "micorremediación" fue acuñado por el micólogo Paul Stamets, que ha estudiado muchos usos potenciales de las setas (Sepehri *et al.*, 2013).

La toxicidad de muchos contaminantes limita la atenuación natural por bacterias, pero los hongos de pudrición blanca pueden soportar los niveles tóxicos de la mayoría de los contaminantes orgánicos. Los hongos de podredumbre blanca son conocidos por su variedad y su notable capacidad para degradar materiales naturales complejos y persistentes. Presentan un sistema no específico, extracelular enzimático, que es capaz de degradar la lignina, uno de los materiales más resistentes que se encuentra en la naturaleza (Korcan *et al.*, 2013)

Los hongos comestibles además de ser una extraordinaria fuente de proteínas y una excelente opción para la alimentación humana, presentan características enzimáticas únicas. Estos hongos presentan enzimas oxidativas no específicas; dentro de las cuales destacan las lacasas y la manganeso peroxidasas (MnP) que son de interés para su aplicación en la biorremediación y pueden ser usadas de manera segura en muchas condiciones. Su batería enzimática extracelular compleja es la responsable del proceso de degradación y está compuesta principalmente por lignino peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP), lacasas y otras enzimas como la glucosa oxidasa y la glioxal oxidasa que generan el peróxido de hidrógeno necesario para la actividad catalítica de la LiP y MnP (Téllez *et al.*, 2010, Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1999).

La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de estas enzimas, les otorga una considerable capacidad de biodegradar y mineralizar compuestos xenobióticos con una estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina (Martín *et al.*, 2004), tales como los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) como el fenantreno, antraceno, colorantes industriales y otros contaminantes del suelo como atrazina, diaminas, fenoles, etc. y llevarlos hasta CO₂ y H₂O ofreciendo un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Las enzimas de los hongos pueden disminuir la biotoxicidad y presumiblemente, también incrementar la disponibilidad de HAPs a futuros procesos de degradación (Maldonado, 2007).

Estas enzimas se secretan en altas tasas en su entorno periférico por lo que degradan una amplia gama de sustratos naturales y sintéticos a pequeñas moléculas que pueden ser absorbidas y metabolizadas en sus células. La eficiencia de los hongos para degradar diversos sustratos recae en varias características: su crecimiento micelial permite el acceso a las partes internas de sustrato, pueden crecer en condiciones de estrés ambiental y bajo condiciones de toxicidad, las enzimas son estimuladas en condiciones de deficiencia de nutrientes, su tasa de crecimiento es alta y los ciclos de vida corto y la degradación fúngica es más rápida que la bacteriana (Goltapeh *et al.*, 2013).

El cultivo y mantenimiento de basidiomicetos para su aplicación en procesos de biorremediación y la elección de los sustratos apropiados para la producción del inóculo son de importancia fundamental para un buen rendimiento de los hongos. También es de suma importancia el tiempo de inoculación del hongo, Ballaminut y Matheus (2007) mencionan que *Psilocybe castanella* y *Lentinus crinitus* presentan una mayor eficiencia en la biorremediación cuando se aplica un inóculo de 10 y 15 días respectivamente, esto cuando los nutrientes están disponibles para garantizar la supervivencia de los hongos, y la vigorosidad de la colonia, dando como resultado un aumento de la biomasa y un complejo enzimático activo.

2.5. Actividad enzimática de los hongos

Los diferentes grados de degradación de la lignina con respecto a los otros componentes de la madera dependen de las condiciones ambientales y las especies de hongos involucrados. Las enzimas ligninolíticas, tales como la manganeso peroxidasa (MnP), lignino peroxidasa (LiP) y lacasas, se secretan principalmente por los hongos de la podredumbre blanca los cuales son los principales degradadores de la lignina de la madera en el medio ambiente natural. Estas enzimas son capaces de degradar una variedad de contaminantes, incluidos los HAPs, los bifenilos policlorados (PCB), y colorantes sintéticos debido a su baja especificidad de sustratos. En base a sus patrones de enzimas ligninolíticas, los hongos que pudren la madera se pueden dividir en tres grupos: 1. Hongos productores de LiP, MnP y lacasas; 2. Hongos productores de MnP y lacasas; y 3. Hongos productores de LiP y lacasas (Korcan *et al.*, 2013).

2.5.1. Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son glicoproteínas monoméricas extracelulares que pertenecen a la familia multicobre oxidasa. Las lacasas se consideran ideales "catalizadores verdes", ya que son capaces de oxidar una amplia variedad de compuestos a una forma sencilla, utilizando O₂ del aire y liberando H₂O como único subproducto (Maté *et al.*, 2011). La lacasa del árbol de la laca fue descrita por primera vez hace 120 años, posteriormente se han estudiado ampliamente las enzimas de plantas y hongos. Los pesos moleculares, pH óptimo, especificidad del sustrato y varias otras propiedades sugieren que existe una gran diversidad de lacasas (Mougin *et al.*, 2003).

Estas enzimas son particularmente producidas por los basidiomicetos ligninolíticos, pero también se encuentran en ciertos procariontes, insectos y plantas, lo que indica que el proceso redox de lacasa es ubicuo en la naturaleza. Las lacasas juegan papeles importantes en varios pasos del biometabolismo, incluyendo los implicados en la pigmentación de hongos, la lignificación de las plantas, la biodegradación de la lignina, la rotación de humus y esclerotización de la cutícula,

produciendo naturalmente compuestos fenólicos de bajo peso molecular y polímeros de fibras naturales que se utilizan como sustratos (Jeon *et al.*, 2011).

Las lacasas contienen 4 átomos de cobre, que se distribuyen en tres sitios de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas. El sitio de T1 contiene el tipo 1 de cobre azul (Cu1), que coordina una cisteína, y es responsable del color azul de la enzima. El sitio T2 contiene un cobre tipo 2 (Cu2), en el sitio T3, el Cu3a y Cu3b que están fuertemente acoplados. Las lacasas comprenden usualmente 520-550 aminoácidos, con un peso molecular que oscila desde 60 hasta 80 kDa. Se producen en las células, son secretadas y se acumulan principalmente en el exterior de los filamentos de hifas (Mougin *et al.*, 2003).

Las lacasas se secretan principalmente como múltiples isoenzimas, *P. ostreatus* produce al menos ocho isoenzimas de lacasas, y se presentan 12 genes en el genoma de esta especie, esta heterogeneidad es, sin duda debido a la multiplicidad de genes correspondientes a la producción de lacasas, pero el patrón isoenzimático es más complejo, en parte es el resultado de diferentes modificaciones postraduccionales como el procesamiento proteolítico, glicosilación, etcétera (Janusz *et al.*, 2013). Tal diversidad en las isoenzimas de lacasas se atribuyó primero a modificaciones postraduccionales del mismo producto génico, pero la caracterización de varias familias de genes de lacasa sugirió que al menos una parte de esta diversidad bioquímica podría ser el resultado de la multiplicidad de genes en los genomas de hongos, la expresión diferencial de genes de lacasas se han informado de algunos hongos (Singh y Kumar, 2010).

2.5.2. Manganeso peroxidasas

Las manganeso peroxidasas son las peroxidasas ligninolíticas extracelulares más comunes producidas por hongos de la podredumbre blanca, junto con lacasas y lignina peroxidasas, se considera que desempeñan un papel activo en el proceso de despolimerización de lignina. Esta clase de peroxidasas incluye dos tipos de enzimas: manganeso peroxidasa dependiente de Mn^{2+} (MnP) y peroxidasa independiente de Mn^{2+} (peroxidasa versátil). La MnP oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , siendo el primero un co-sustrato obligatorio para esta enzima, ya que se requiere para completar el ciclo catalítico,

mientras que la peroxidasa versátil (VP), además de tener preferentemente la actividad MnP y ser estructuralmente relacionada con MnP a nivel de genes y proteínas, puede directamente oxidar sustratos aromáticos (Salame *et al.*, 2013).

Manganeso peroxidasas (MnP; EC 1.11.1.13) son glicoproteínas hemo con un peso molecular de aproximadamente 46 000 kDa y se produce como una familia de isoenzimas (Korcan *et al.*, 2013). Durante el ciclo catalítico, el centro activo es oxidado por H₂O₂. La enzima oxida Mn²⁺ a Mn³⁺, esto facilitado por ácidos orgánicos del hongo tales como oxalato o malonato (Schlosser y Hofër, 2002).

Los ácidos orgánicos tales como malato y tartrato estimulan la actividad catalítica de MnP mediante el quelante Mn³⁺. Las especies quelantes de Mn³⁺ resultantes son pequeños oxidantes difusibles, que pueden actuar al estar distanciados del sitio activo de MnP. Son intermediarios que no están fuertemente oxidados y por consiguiente son incapaces de atacar las estructuras no fenólicas y recalcitrantes que predominan en la lignina. Sin embargo, los quelantes Mn³⁺ oxidan las estructuras fenólicas más reactivas que componen aproximadamente el 10% de la lignina (Korcan *et al.*, 2013).

Muchos hongos de la podredumbre blanca poseen típicamente un conjunto de múltiples isoenzimas de manganeso peroxidasa, codificadas por genes aparentemente redundantes relacionados estructuralmente, que componen una familia de genes. Los estudios sobre las propiedades catalíticas de las diversas isoenzimas demuestran diferencias claras tanto en las condiciones de cultivo y especificidad de sustratos asociados con su transcripción y constantes cinéticas. Esta diversidad, junto con la amplia gama de especificidad de sustrato y su notable potencial de degradación, hace que estas peroxidasas atractivos biocatalizadores versátiles para aplicaciones biotecnológicas y ambientales, por ejemplo, en la fabricación de pasta y blanqueo, en la eliminación de desechos peligrosos, y en la síntesis de ciertos compuestos orgánicos (Salame *et al.*, 2013).

2.5.3. Lignino peroxidasas

La lignino peroxidasa (LiP) fue una de las primeras enzimas ligninolíticas por descubrir, es considerada como un agente ligninolítico importante que puede actuar en conjunto

con otros oxidantes más pequeños para penetrar y abrir la pared celular de la madera. La oxidación catalizada por la LiP de una subestructura de lignina comienza con la extracción de un electrón del anillo aromático del sustrato donante, y las especies resultantes, un radical arilo de cationes, después se somete a una variedad de reacciones post enzimática (Korcan *et al.*, 2013).

La lignino peroxidasa (CE 1.11.1.14) es una peroxidasa extracelular que contiene un grupo hemo dependiente de H₂O₂ y tiene un potencial redox inusualmente alto a pH óptimo, típicamente muestran poca especificidad hacia sustratos y degrada una variedad de compuestos relacionados con la lignina. Cuenta con masas moleculares entre 38 y 47 kDa. La LiP es bien conocida como parte del sistema ligninolítico tanto de hongos Aphylophorales y Agaricales. El papel de LiP en la degradación de la lignina podría estar más lejos de la sola transformación de fragmentos de lignina que se liberan inicialmente por MnP. Los estudios han demostrado que la LiP puede no ser esencial para el ataque a la lignina, ya que varios hongos de la podredumbre blanca son altamente activos en la descomposición de la hojarasca (Korcan *et al.*, 2013).

2.5.4. Celulasas

Las celulasas o hidrolasas O-glucosil, son un grupo de enzimas producidas por hongos y bacterias que hidrolizan el puente glicosídico entre dos o más carbohidratos. Estos complejos enzimáticos están compuestos por varios tipos de enzimas, entre las cuales se incluyen las hidrolasas, enzimas hidrolíticas complejas especializadas en el rompimiento y descomposición del enlace glicosídico β -1,4 de la celulosa transformándola en glucosa con el fin de metabolizar y cumplir así con sus funciones vitales (Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

2.6. Genes que codifican para enzimas ligninolíticas de *Pleurotus*

El genoma de *P. ostreatus* incluye 12 genes de lacasas, seis aparecen agrupados en la región del subtélomero en el cromosoma VI, y los otros en los mapas de los cromosomas IV, VI, VII, VIII y XI. Se ha identificado que *P. ostreatus* produce al menos

ocho isoenzimas de lacasas. Sin embargo, sólo seis isoenzimas de lacasas, POXA1b (Lacc6), POXA1w, POXA2, POXA3a (Lacc2), POXA3b, y POXC (Lacc10), se han caracterizado bioquímicamente hasta la fecha. Entre ellas, LAcc2, Lacc6 y Lacc10 son las más estudiadas, y sus genes se han expresado de forma heteróloga en la levadura. Además, dos nuevas isoformas de lacasas en fermentación sólida de *P. ostreatus* se han descrito recientemente, aunque permanecen sin caracterizar. (Castanera *et al.*, 2012). La gran similitud en la secuencia y la estructura idéntica de exón-intrón en los genes POXC, POX1 y POX4 junto con el alto grado de similitud entre los amino ácidos de la proteína correspondientes a las secuencias indican una estrecha relación entre estos genes y sugieren la existencia de una "subfamilia lacasa" dentro del genoma de esta especie (Janusz *et al.*, 2013).

Se encontró recientemente que *P. ostreatus* expresa nueve genes para MnP: *mnp1*, *mnp2*, *mnp3*, *mnp4* y *mnp5*, *mnp6*, *mnp7*, *mnp8* y *mnp9*, los cuales componen la familia de genes de MnP. Las manganeso peroxidases de *Pleurotus* corresponden a la subfamilia de MnPs "cortas", en comparación con los típicos MnPs "largas" de *Phanerochaete chrysosporium*. Las MnPs largas son específicas para Mn²⁺, mientras que las MnPs cortas tienen una especificidad de sustrato más amplia y son capaces de oxidar fenoles, aminas, y 2,2azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico) (ABTS) en ausencia de Mn²⁺. Las peroxidases codificadas por *mnp3*, *mnp6*, *mnp7*, *mnp8*, *mnp9* se han caracterizado como MnPs cortas (MnP3, MnP6, MnP7, MnP8 y MnP9, respectivamente; mientras que *mnp1*, *mnp2*, *mnp4* y *mnp5* codifican para VPs (VP1, VP2, VP4, y VP5) (Salame *et al.*, 2013).

Las lignino peroxidases pertenecen a la clase II de peroxidases secretadas por hongos. Hasta la fecha, más de 65 genes han sido secuenciados y presentados al GenBank. La familia de peroxidases extracelulares monoméricas hemo-glicoproteína-lignina constan de unas cuantas isoenzimas en algunas especies y hasta 16 isoenzimas identificadas en cultivos de *Trametes versicolor*. El análisis de los genes de LiP reveló que cada isoforma se codifica por un marco de lectura abierto diferente pero homólogo (Janusz *et al.*, 2013).

2.7. El género *Pleurotus* en la biorremediación

El género *Pleurotus* presenta una gran capacidad para degradar PCB (bifenil policlorinados), atrazina, lindano, DDE (diclorodifenildicloroetileno) (Spezzia, 2012). Los efectos de la mineralización por los hongos de la pudrición blanca incluyen también los HAPs de tres anillos como el antraceno y fenantreno. De manera importante, los hongos de pudrición blanca son los únicos organismos capaces de mineralizar significativa los HAPs (Kuhad *et al.*, 2013; Pointing, 2001,). Por lo que son una alternativa para degradar hidrocarburos mediante la bioaumentación. Dentro del género *Pleurotus* se encuentra *P. levis*.

2.7.1. *P. levis* en la biorremediación

P. levis es considerado como un hongo comestible que crece de forma silvestre en México, en el bosque mesófilo de montaña, en troncos de árboles de madera relativamente blanda y se detecta fácilmente por el tamaño y forma de su basidiocarpo (López y García, 2009).

P. levis requiere de 44 días para colonizar el sustrato y 21 para producir basidiomas a 21°C, presenta una eficiencia biológica de 71.34% sobre sustrato de paja de *Digitaria decumbens* (70%) y pulpa de café (30%) (Huerta, 2009). Sobre sustrato de paja de cebada presenta una eficiencia de 53.8%. Su cuerpo fructífero tiene un velo en las primeras etapas de su desarrollo que retrasa la descarga de esporas en comparación con *P. ostreatus*, el cual lleva a cabo la liberación de esporas desde las primeras etapas de su desarrollo. Esta característica de *P. levis* puede tener ventajas prácticas en el cultivo comercial. Una característica bioquímica de este recursos genético es que produce más celulasas y proteínas que el resto de las especies de *Pleurotus* (Morales *et al.*, 2010).

Según Spezzia (2012), la cepa de *P. levis* se encuentra entre los hongos que mostraron mayor actividad de lacasas, a pesar de su lento crecimiento, produjo una actividad considerable y un tamaño de halo oxidativo mayor que su crecimiento micelial, lo que demostró un alto potencial enzimático para la degradación de hidrocarburos.

Son pocos los estudios realizados sobre el desarrollo y crecimiento de *P. levis* y a excepción de los ensayos realizados por Spezzia (2012) no existen estudios sobre la actividad de enzimas ligninolíticas de *P. levis*, como tampoco se ha investigado su capacidad de tolerancia y potencial enzimático para degradar compuestos tóxicos.

2.8. Propiedades del ácido acetil salicílico (AAS)

El término salicilato se ha utilizado para la descripción de un grupo de compuestos químicos que presentan el radical 2-hidroxibenzoico. Dentro de estos compuestos se encuentran el salicilato de sodio, el éster y metilo del ácido salicílico, así como el ácido acetilsalicílico, los cuales son de gran utilidad química en agricultura (López *et al.*, 1998). Entre los efectos que causa el ácido salicílico (AS) en el desarrollo de los vegetales se tiene: inhibición de la germinación o del crecimiento de raíz y coleoptilo, inducción de la floración e inhibición de la misma, provoca cierre de estomas y reducción de la transpiración, mantiene turgente los estomas y pulvinolos y, altera la permeabilidad de los tilacoides (López *et al.*, 1998). Algunos efectos del ácido acetil pueden ser causados por las propiedades químicas generales del ácido acetil salicílico (como un quelante de hierro o ácido) (Klessig y Malamy, 1994).

Se ha reportado que el ácido salicílico (AS) conjuntamente con el ácido jasmónico regulan la biosíntesis de metabolitos secundarios (Bennet y Wallsgrove, 1994). Pertenece a un grupo muy diverso de sustancias conocidas como compuestos fenólicos, está presente en las plantas y forma parte del grupo de los salicilatos, cuya característica química los relaciona por presentar el radical 2-hidroxibenzoico como el ácido acetilsalicílico y el metilo de AS (Villanueva, 2009).

Estudios recientes de Rendón-Hernández (2015) indican que el ácido acetil salicílico tiene un efecto en la fisiología de los hongos *Fistulina guzmanii*, *Volvariella bombycina* y *Hericiium erinaceus*, así como en su eficiencia biológica y la cantidad de proteínas a una concentración de AAS 100 µM.

2.9. Biotecnología y desarrollo

La biotecnología es considerada como una de las áreas de desarrollo científico y tecnológico más relevantes en la actualidad. Su uso e impacto involucra áreas como

la salud, el sector agrícola, pecuario, el medio ambiente, y el sector industrial entre otros, las cuales son la base del desarrollo de los países latinoamericanos (FAO, 2004).

El gran desarrollo científico y tecnológico, particularmente en el ámbito de las ciencias de la vida, que se ha dado desde los años cincuenta del siglo pasado, nos ha permitido aplicar principios científicos y de ingeniería a la transformación de materiales por acción de agentes biológicos (microorganismos, enzimas, células de animales o de plantas, principalmente) con el fin de proveer a nuestra sociedad de bienes y servicios (Blanch, 2010).

México, con más de 100 millones de habitantes, y con crecimiento previsible de 20 millones más en los próximos 20 años, enfrenta grandes retos para poder proporcionar a sus habitantes servicios y condiciones necesarios para una vida digna. Las demandas por alimentos seguros y nutritivos, medicamentos y servicios de salud modernos, con un medio ambiente no contaminado por industrias con procesos limpios y productos competitivos cuidando y usando sustentablemente nuestra biodiversidad, representan retos extraordinarios para la sociedad mexicana que debemos enfrentar y resolver de manera concertada, inteligente y respetuosa con el medio ambiente. La biotecnología es una de las herramientas más poderosas con las que cuenta México para contender con muchos de estos retos nacionales (Bolívar-Zapata, 2003).

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define la biotecnología como: toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (FAO, 2004). Se trata de una tecnología que tiene un conjunto de principios científicos y técnicos comunes y, una larga lista de técnicas aplicables a desarrollos específicos. Es una plataforma tecnológica que sirve de base para tecnologías de uso concreto en actividades productivas (Bisang, 2009).

Al ser considerado México como un país biológicamente megadiverso, la biotecnología moderna debe servir para el manejo y preservación de estos recursos, indispensables para el mantenimiento sustentable de los ecosistemas nacionales y globales. Y, precisamente por la gran diversidad con la que cuenta además de

promover el desarrollo de la investigación biotecnológica, es necesario generar capacidades para analizar y evaluar las múltiples implicaciones del uso de la biotecnología; en el ámbito ecológico, el de la salud humana, en los sectores de la producción y en el aspecto social (Bolívar-Zapata, 2003).

2.10. Biotecnología de hongos comestibles

México posee una gran cantidad de recursos fúngicos, de los cuales apenas conocemos un bajo porcentaje de ellos. Entre esta gran diversidad encontramos a los macromicetos, de los cuales algunas especies son consideradas comestibles y pueden ser aprovechadas como un recurso no maderable para las comunidades cercanas a bosques y selvas, ya sea para autoconsumo o para su comercialización. El estudio más a fondo de estas especies podría, en un futuro no muy lejano, dar pie a su cultivo (*in vitro*) o semicultivo (*in situ*). La mejora en el cultivo de hongos mediante el aumento de la producción de enzimas extracelulares a través de procedimientos convencionales de mejoramiento, es altamente probable y sería muy útil debido a que tales cepas podrían aumentar la bioconversión de sustratos. Esta es un área importante donde la aplicación de las nuevas técnicas genéticas se beneficiara tanto de la tecnología académica e industrial. La biotecnología es un factor clave en el desarrollo de los procesos económicos para la conversión completa de la lignocelulosa a alimentos útiles (Ohga y Kitamoto, 1997).

Estudios sobre la acción de las lacasas en sustratos orgánicos naturales *in vivo* sugieren que las enzimas son útiles en la biotecnología. De las lacasas disponibles de diversas especies (por ejemplo, bacterias, insectos, hongos y plantas), las lacasas fúngicas son de particular interés comercial debido a que tales enzimas tienen un potencial redox relativamente alto; por lo tanto son más adecuadas para su uso en los procesos oxidativos que otras formas de lacasas. Por otra parte, las lacasas fúngicas son secretadas extracelularmente, representando una ventaja para la purificación de la enzima y para aplicaciones biotecnológicas. Las lacasas fúngicas han demostrado ser útiles en varias áreas de la biotecnología, incluyendo la síntesis orgánica, pulpa y blanqueo textil, biorremediación, injerto químico y modificación de la superficie de polímeros (Jeon *et al.*, 2011).

La biotecnología de producción de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México, es fundamental para fortalecer la sostenibilidad agrícola mediante el aprovechamiento y reciclaje de subproductos agroindustriales y forestales; para obtener un alimento humano socialmente aceptado de alto valor medicinal, proteínico y para incrementar la rentabilidad de los cultivos agrícolas (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

2.11. Importancia de los hongos comestibles

El consumo de los hongos comestibles en México es una tradición que se remonta a tiempos prehispánicos y que en la actualidad aún se mantiene viva. Los hongos silvestres no sólo fueron para los antiguos pobladores de México una importante fuente alimenticia, sino que ciertas especies (como los hongos alucinógenos) se utilizaron en sus rituales sagrados (Mata *et al.*, 2007).

El cultivo de hongos comestibles constituye un verdadero sistema de producción-consumo, el cual ha adquirido gran relevancia social, económica y ecológica a nivel mundial. Se trata de procesos biotecnológicos aplicados que pueden desarrollarse a pequeña y gran escala para producir: 1) Alimento humano de buena calidad nutricional y con propiedades medicinales (anticancerígenas, antibióticas, que reducen el nivel de colesterol y la hipertensión, antitrombóticas, antidiabéticas); 2) Suplementos alimenticios; y 3) Enzimas y productos metabólicos con amplio potencial de utilización en la industria.

El substrato degradado residual, compuesto principalmente por materiales lignocelulósicos utilizados para la producción de hongos comestibles, es en realidad un subproducto que puede tener diversas aplicaciones bastante prometedoras, tales como: 1) Abono orgánico para la industria hortícola y de floricultura, ya sea composteado con otros materiales orgánicos o sin compostear; 2) Substrato nematocida; y 3) Substrato para la biorremediación *in situ* de agua y suelo en regiones contaminadas por hidrocarburos o residuos orgánicos similares a la lignina, tales como el pentaclorofenol (PCP), hidrocarburos poliaromáticos (HAPs), bifenoles policlorados (PCBs), y pesticidas organofosforados. Este substrato parcialmente degradado contiene una gran variedad de enzimas extracelulares y sustancias nutritivas, las

cuales al aplicarse directamente en zonas contaminadas permiten la degradación de compuestos contaminantes y favorecen el desarrollo de otros microorganismos (Mora y Martínez-Carrera, 2007).

La diversidad de sustratos disponibles, sobre todo aquellos que son subproductos de la agricultura y de la actividad forestal, aunado a la variedad de climas en México, generan un abanico de posibilidades para el cultivo de diversas especies de hongos comestibles (Mata *et al.*, 2007).

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Debido a que México es un productor y exportador de petróleo, el país presenta problemas de contaminación, sobre todo en lugares donde hay pozos de extracción o campos de refinación. Los derrames de crudo y sus derivados son debidos principalmente al transporte ya sea marítimo, terrestre o por oleoductos. Los contaminantes vertidos al suelo y al agua subterránea aumentan cada año paralelamente con el crecimiento de la industria y la demanda de energía (Gómez, 2009).

Este problema ambiental no es sólo de México sino de un gran número de países productores y exportadores de petróleo. La contaminación de los ecosistemas con petróleo es un problema que ha estado presente a través del tiempo y muchos estudios se han enfocado en la evaluación de la degradación de hidrocarburos persistentes en el ambiente, en especial los hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) (Castro-Carrillo *et al.*, 2008). La importancia de la contaminación por los hidrocarburos está determinada por sus características mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas. Además, la propiedad de la baja solubilidad en agua, dificulta aún más su biodegradación natural (Velazco, 2006). La presencia de contaminantes por sobre ciertos niveles implica múltiples consecuencias negativas para la cadena alimenticia y por lo tanto, para la salud humana (Contreras, 2005).

Los problemas de contaminación con hidrocarburos que en la actualidad se presentan en México, han hecho que se dirijan los esfuerzos tecnológicos hacia procesos naturales de remoción de contaminantes, tales como la biorremediación (Saval, 1988; Fernández *et al.*, 1998). En comparación con las técnicas de remediación físicas y químicas la biorremediación es una técnica de restauración sostenible, debido a que se reducen o elimina los contaminantes del suelo, evitando modificar las propiedades del suelo y alterar lo menos posible el ecosistema. Los hongos comestibles son un recurso genético con un alto potencial para la biorremediación ya que presentan una inespecificidad química y una actividad enzimática única que les permite biodegradar y mineralizar hidrocarburos poliaromáticos (Mancera *et al.*, 2008; Rodríguez-Vázquez, 2012).

México al ser un país megadiverso posee una gran cantidad de recursos fúngicos comestibles que pueden ser aprovechados en procesos de biorremediación. La biotecnología de hongos comestibles tiene un papel importante en el desarrollo de tecnologías para la restauración de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos, por lo que es de interés caracterizar nuevas especies de hongos comestibles con potencial enzimático. Estudios realizados por Spezzia (2013) identificaron a la especie nativa *Pleurotus levis* (CP-30) dentro de los hongos comestibles con mayor potencial enzimático. Sin embargo, se conoce poco sobre su desarrollo micelial y se desconoce su capacidad de reacción y producción de enzimas en situación de contaminación por HAPs. Con base en lo anterior, la presente investigación se enfocó en determinar el potencial enzimático de *P. levis* (CP-30), así como incrementar su actividad enzimática mediante la adición de ácido acetilsalicílico y determinar su actividad enzimática en presencia de un hidrocarburo poliaromático, el antraceno. Esto con el fin de plantear una propuesta de estrategia de biorremediación de suelos agrícolas contaminados por hidrocarburos y fomentar el interés en las posibilidades que ofrecen los hongos comestibles para procesos de biorremediación que permitan aprovechar los recursos genéticos de México, utilizando los residuos agrícolas que sirven de sustrato para el cultivo, los cuales contienen enzimas degradadoras de hidrocarburos.

IV. HIPÓTESIS

La especie nativa *Pleurotus levis* (CP-30) presentará una mayor actividad enzimática (lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas) que la especie de referencia *P. ostreatus* (CP-754) en presencia de antraceno, por lo que puede potencialmente usarse a futuro para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial enzimático (lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas) de una cepa nativa de *Pleurotus levis* (CP-30), en forma comparativa con una cepa de referencia de *P. ostreatus* (CP-754) en presencia del hidrocarburo poliaromático antraceno, proponiendo una estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados por petróleo en México.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Determinación de pH

Se tomaron 3 muestras de 5 mL de cada caja de Petri en todos los experimentos realizados. Se homogeneizaron con una mezcladora comercial manual Hamilton Beach a máxima velocidad durante 1 minuto. El equipo Conductronic PH120 fue previamente calibrado a pH de 7 y 9 con soluciones buffer estandarizadas marca Mettler Toledo, a las muestras se les midió el pH y la temperatura.

6.2. Medición del área de la colonia (cm²) y velocidad de crecimiento micelial (cm día⁻¹)

Se captaron imágenes de cada repetición de los tratamientos y testigos, dependiendo de los tiempos de muestreo en cada experimento. Para ello se empleó una cámara Cyber-Shot Sony (DSC-H7) y una cámara Nikon 5100 y un trípode. Las cajas Petri se colocaron sobre un fondo negro y en el extremo superior se colocó una regla como referencia del tamaño de la caja de Petri y al crecimiento de la colonia.

Una vez tomadas las imágenes se analizaron con el programa Image J 1.47v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Para calcular el área de crecimiento micelial en el programa, para cada imagen tomada se ajustó la escala y se midió el contorno de la colonia. Para medir la velocidad de crecimiento se partió del contorno inicial de la colonia al contorno que presentó en el tiempo de toma de la muestra. Los datos fueron guardados en una hoja de cálculo Excel versión 2010 y se determinó para cada tratamiento y testigo el promedio y la desviación estándar de las réplicas de cada experimento. Según la variable se expresó en cm² para el área de la colonia y de cm día⁻¹ para la velocidad de crecimiento lineal.

6.3. Determinación del contenido de proteínas (µg mL⁻¹)

Para calcular el contenido de proteínas se utilizó el método de Bradford (Figura 4), que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible del colorante Coomassie Blue G-250 cuando éste se une a las proteínas a una longitud de onda de 595 nm. Se preparó la solución BSA 500 µg mL⁻¹ en base a la cual se realizó la curva de calibración a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg mL⁻¹.

1. En un microplaca de poliestireno de 96 pozos con base en forma de U estéril (Kima, Vacutest) y con la ayuda de una pipeta automática multicanal de 8 puntas se colocaron 80 μL de muestra en cada pozo y se agregaron 20 μL de colorante Biorad Protein Stains, se homogenizó cada pozo y se dejó incubar por 30 minutos en oscuridad y posteriormente, se leyó la microplaca a una absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Epoch-Biotek.

Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel. En base a las absorbancias de la curva se obtuvo la ecuación de la recta $Y=mx+b$, para determinar el contenido de proteínas de cada muestra. Se determinó para cada tratamiento y testigo el promedio y la desviación estándar.

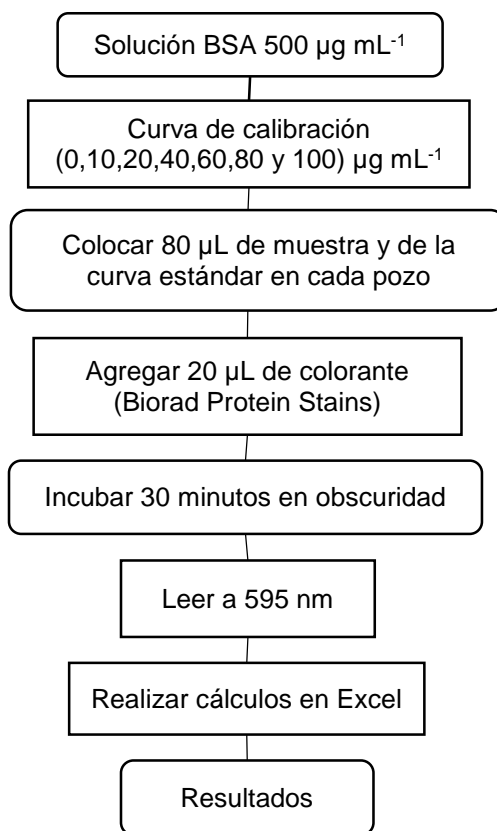


Figura 4. Determinación de proteínas por el método de Bradford en microplaca.

6.4. Determinación de la actividad de lacasas en microplaca (U mL^{-1})

Para la determinación de la actividad de lacasas se utilizó el método de Bourbonnais *et al.* (1998), que consiste en utilizar un sustrato indicador que es el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), ya que permite seguir la cinética de

reacción de las peroxidasas, su máximo de absorbancia de luz es a 420 nm. Se preparó una solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5 y ABTS 1 mM. En la microplaca y con la ayuda de una pipeta automática multicanal se colocaron 160 μL de solución reguladora de acetato de sodio pH 5 en cada pozo y se agregaron 20 μL de muestra o de agua para el blanco y 20 μL de ABTS, se homogeneizó cada pozo y se procedió a leer a 420 nm en el espectrofotómetro de microplacas Epoch-Biotek durante 8 minutos. Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel y se analizaron. Una unidad de actividad de lacasas se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, usando un coeficiente de extinción de $36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Bourbonnais y Paice, 1998) (Figura 5).

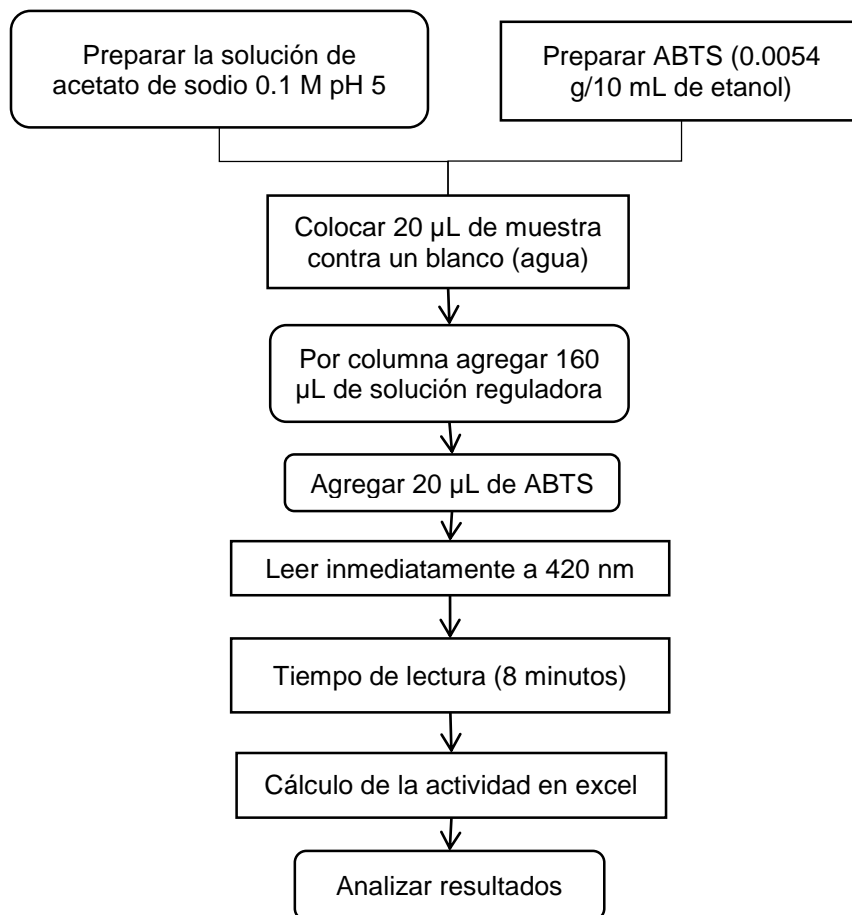


Figura 5. Determinación de la actividad de lacasas por el método de Bourbonnais *et al.* (1998) en microplaca.

6.5. Determinación de la actividad de manganeso peroxidasas ($U L^{-1}$) en microplaca

La determinación de la actividad de MnP se basó en la oxidación del complejo de MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride) y DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) en la presencia de H_2O_2 y Mn^{2+} (Mathieu *et al.*, 2013). Se realizaron dos soluciones de trabajo (A y B). La solución A se preparó con 5 mL de solución reguladora de acetato de sodio (100 mM, pH 4.5), 0.5 mL de DMAB (50 mM) y 1 mL de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (1mM). La solución B llevó las mismas soluciones excepto $MnSO_4$, el cual fue remplazado por EDTA (2mM). Se adicionaron 140 μL de solución de trabajo A o B a 50 μL de sobrenadante y 10 μL de H_2O_2 (1 mM) en la microplaca. Después de 1 hora de incubación a 25 °C en oscuridad, se midió la absorbancia a 590 nm ($\epsilon=32000 M^{-1} cm^{-1}$). Los valores obtenidos de la solución B fueron restados a los obtenidos de la solución A para obtener la actividad enzimática de MnP dependiente de Mn^{2+} (Figura 6).

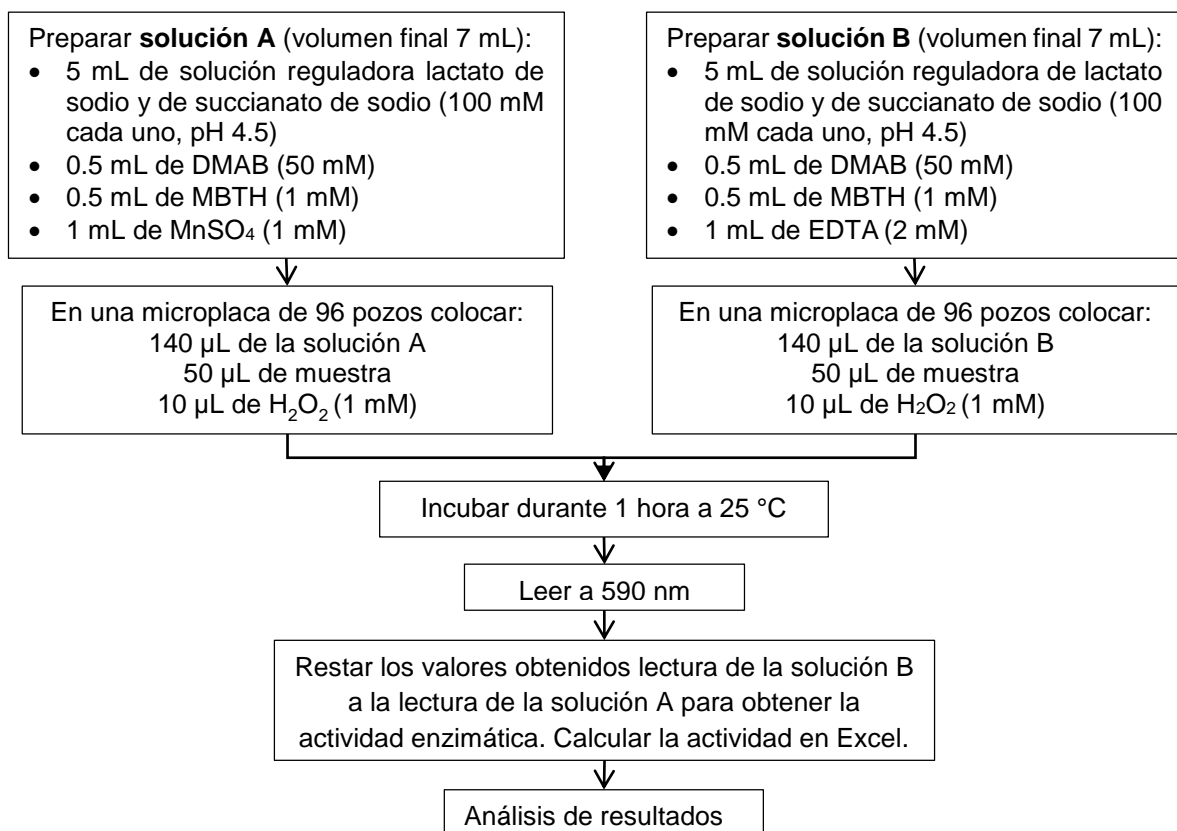


Figura 6. Determinación de la actividad de manganeso peroxidasas por el método de Mathieu *et al.* (2013) en microplaca.

6.7. Determinación de la actividad de lignino peroxidasas ($U L^{-1}$) en celda

Para determinar la actividad de LiP se utilizó el método de Tien y Kirk (1989), que consiste en la oxidación del alcohol veratrílico mediante H_2O_2 . La reacción se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 1.5 mL con un volumen final de 1 mL. La mezcla de reacción contiene 200 μL de 3,4-dimethoxybenzyl alcohol 10 mM, 200 μL de solución reguladora tartrato de sodio 250 mM pH 4.5, 500 μL del sobrenadante de la muestra y 100 μL de H_2O_2 al 0.03%. El volumen de la reacción se traspasó a celdas de 1 mL y se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda EZ201 Perkin Elmer a una longitud de onda de 310 nm. Una unidad de la actividad de LiP fue definida como 1 μmol de alcohol veratrílico oxidado por minuto, usando un coeficiente de extinción de $9\ 300 M^{-1} cm^{-1}$ (Figura 7).

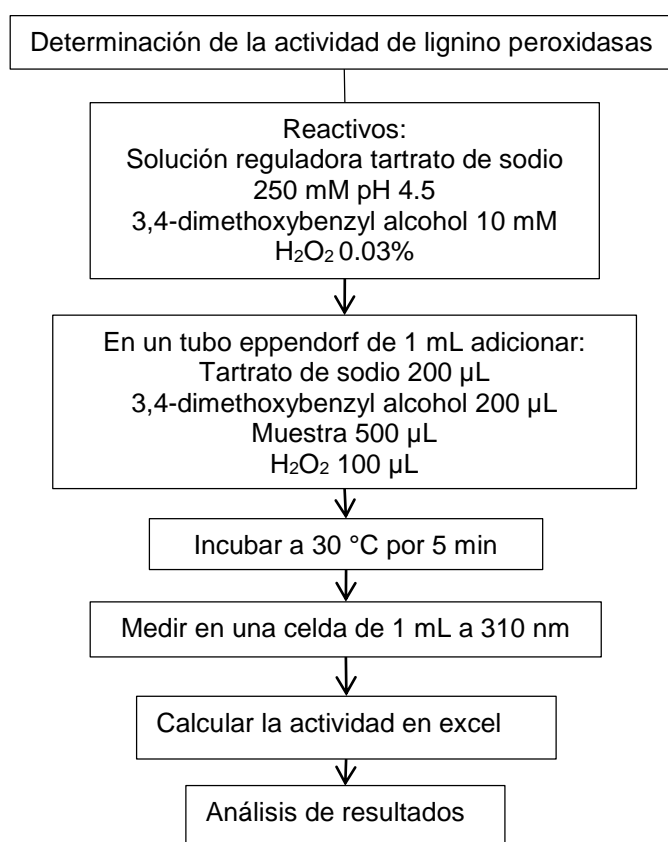


Figura 7. Determinación de la actividad de lignino peroxidasas por el método de Tien y Kirk (1989) en celda.

6.8. Determinación de la actividad de celulasas (g L⁻¹) en microplaca

Para la determinación de celulasas se utilizó el método de Wood *et al.* (2012), que consiste en realizar dos reacciones: una de hidrólisis y otra de reducción de glucosa. Para ello se preparó CMC (Carboximetil celulosa) al 1%, el reactivo DNS (3,5 dinitro salicílico), una solución concentrada de 100 g L⁻¹ de glucosa, a partir de la cual se realizó la curva de calibración de glucosa a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30 g L⁻¹). Para preparar el reactivo CMC al 1% se disolvió 0.1 g de CMC en 10 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM a pH 5.

Para realizar la reacción de hidrólisis se colocaron en una microplaca para PCR 30 µL de la muestra y 30 µL de CMC al 1% y se incubó en el equipo GeneAmp-PCR System 9700 a 50 °C en dos ciclos, uno de 90 minutos y otro de 30 minutos. Para la reducción de glucosa se tomaron 9 µL de la reacción de hidrólisis y se colocaron en tubos eppendorf de 500 µL y se les adicionaron 171 µL del reactivo DNS y se incubaron a 99.9 °C durante 1 minuto y después a 20 °C durante 2 minutos en el equipo GeneAmp-PCR System 9700. Se tomaron 90 µL de la reacción y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con base en forma de U estéril (Kima, Vacutest) y se procedió a leer a 540 nm en el espectrofotómetro de microplacas Epoch-Biotek. Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel. En base a las absorbancias de la curva se obtuvo la ecuación de la recta $Y=mx+b$ para determinar la actividad de celulasas de cada muestra. Se obtuvo para cada tratamiento y testigo el promedio y la desviación estándar (Figura 8).

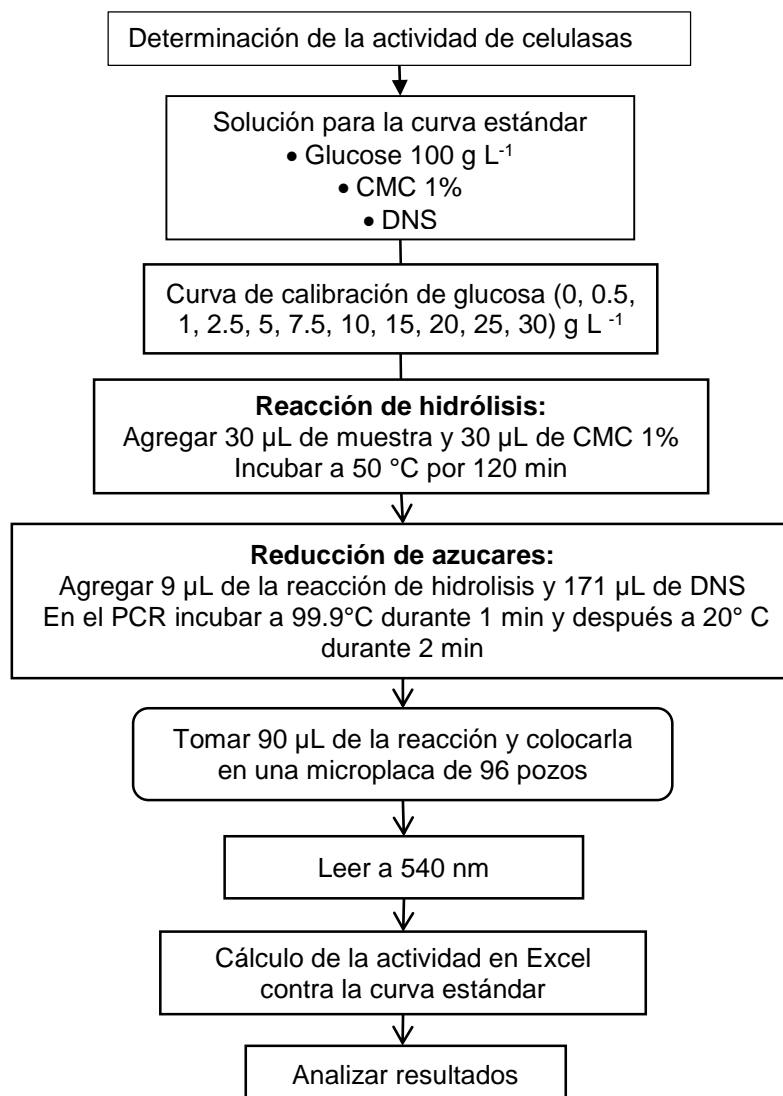


Figura 8. Determinación de la actividad de celulasas por el método de Wood *et al.* (2012) en microplaca.

6.9. Análisis estadístico

En todos los experimentos los cultivos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron con medias y desviación estándar. Los resultados más relevantes se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se les aplicó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron en el programa SAS 9.0.

VII. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ENZIMÁTICO DE *Pleurotus ostreatus* (CP-754) COMO CEPA DE REFERENCIA

7.1. Resumen

Se caracterizó el desarrollo micelial y la actividad de lacasas, manganeso peroxidadasas (MnP) y lignino peroxidadasas (LiP) en medio de cultivo semisólido agar con extracto de malta (EMA) adicionado con ácido acetil salicílico (AAS) 100 μM para potencializar la actividad enzimática de la cepa de estudio. También se determinó el potencial enzimático en medio de cultivo EMA con AAS 100 μM en presencia de 0.4 g de antraceno. La actividad de lacasas (88.653 U mL^{-1}), MnP (0.631 U L^{-1}) y LiP (5.773 U L^{-1}) de *P. ostreatus* (CP-754) se vieron incrementadas con la adición de AAS 100 μM después de 15 días de incubación. En presencia de 0.4 g de antraceno *P. ostreatus* presentó una mayor actividad de lacasas, MnP y LiP en las muestras que se tomaron del lado opuesto de la colonia que no estuvo en contacto con el antraceno. La mayor actividad de lacasas fue de 11.134 U mL^{-1} cultivada en EMA+AAS 100 μM (tratamiento 1) y, de 12.487 U mL^{-1} EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (tratamiento 2), para MnP fue de 0.318 U L^{-1} en el tratamiento 1 y de 0.388 U L^{-1} en el tratamiento 2 y, para LiP fue de 2.58 U L^{-1} en el tratamiento 1 y de 2.582 U L^{-1} en el tratamiento 2. Por lo que *P. ostreatus* (CP-754) presentó un potencial para enzimas como lacasas y MnP en presencia de AAS y expuesto a 0.4 g de antraceno.

7.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar el desarrollo micelial y las condiciones de cultivo de *P. ostreatus* a nivel de laboratorio.
2. Determinar el potencial enzimático de la *P. ostreatus* (CP-754) en EMA adicionado con AAS 100 μM y 0.4 g de antraceno.

7.3. Materiales y Métodos

7.3.1. Reactivación de *P. ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo EMA

Se reactivó la cepa de *P. ostreatus* (CP-754) registrada en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Para lo cual se preparó medio de cultivo semisólido EMA según lo indica el fabricante Bioxon (33.6 g en 1000 mL), se disolvió a 100 °C y se esterilizó a 121 °C por 25 min. Posteriormente, el medio estéril se vació en cajas de Petri de 60x15 mm y se dejaron gelificar. En la campana de flujo laminar se procedió a cortar con una aguja de disección estéril pequeños fragmentos de micelio de 0.5 cm de diámetro, los cuales se colocaron en el centro de las cajas de Petri con medio de cultivo semisólido EMA, se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente (Figura 9).



Figura 9. Inóculo de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA.

7.3.2. Preparación de los medios de cultivo

La cantidad de medio empleado por caja de Petri fue de 40 mL por replica. Para ello se utilizaron tubos de ensaye con tapa de baquelita y se midieron 40 mL de medio con una probeta. El medio se calculó para preparar cajas de Petri con EMA sin AAS (Testigo) y EMA con AAS 100 μ M (Tratamiento 1). El cuadro 1 resume la elaboración de los tratamientos propuestos en esta investigación. El tratamiento 2 consistió en EMA con AAS 100 μ M en presencia de 0.4 g de antraceno, lo que equivale a 0.4 g mL⁻¹ de agar. Tanto al testigo, como a los tratamientos 1 y 2 se les elaboró un blanco, el cual consistió en cajas de Petri sin inocular. Los blancos sirvieron como prueba de esterilización y para determinar el pH inicial y final. Se esterilizaron los tubos a 121°C

por 25 min. Los tubos estériles con el medio se vaciaron en cajas de Petri de 100x15 mm y se dejaron gelificar.

Cuadro 1. Descripción de la manera que se definieron las condiciones del experimento, la siembra y los tratamientos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* (CP-754).

Muestra	Tipo de inóculo	Condiciones de cultivo	Tamaño de la muestra (mL)
Testigo 1	Convencional	EMA	40
Tratamiento 1	Convencional	EMA+AAS 100 μ M	40 y 6
Tratamiento 2	Convencional	EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno	6

7.3.3. Cinética con inóculo convencional

El inóculo convencional de *P. ostreatus* (CP-754), se tomó de una caja de Petri de 60x15 mm con micelio crecido previamente durante 15 días en la campana de flujo laminar, con un popote de plástico estéril se cortaron círculos de la colonia de aproximadamente 5 mm de diámetro y con una aguja de disección estéril se colocaron en un extremo de una caja de Petri de 100x15 mm en todas las condiciones estudiadas.

7.3.4. Variables estudiadas

Las variables analizadas se definieron de acuerdo a la cinética, al volumen de la muestra y a la toma de muestra (Cuadro 2). Se pueden comparar por el tamaño de muestra (40 mL) el testigo y el tratamiento 1. El tratamiento 1 se comparó con los resultados del tratamiento 2 por el volumen de la muestra empleada (6 mL).

7.3.5. Fisiología y enzimas de *P. ostreatus* (CP-754)

7.3.5.1. Testigo 1 (EMA)

Se midió la actividad enzimática de *P. ostreatus* (CP-754) al testigo 1 y al blanco a tiempo inicial y tiempo final de la cinética. Se realizaron 3 repeticiones al testigo y al blanco, para cada toma de muestra. Se determinó el pH, la actividad de lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas (Figura 10).

Cuadro 2. Variables analizadas en cada muestra.

Muestra	Variable	Muestreo	Volumen de la muestra (mL)
Testigo 1	Lacasas, MnP, LiP, pH	0, 3, 6, 9, 12 y 15 días	40
Tratamiento 1	Lacasas, MnP, LiP, pH, área, velocidad de crecimiento	0, 3, 6, 9, 12 y 15 días	40
		T0, AC, DC, CC*	6
Tratamiento 2	Lacasas, MnP, LiP, pH, área, velocidad de crecimiento	T0, AC, DC, CC	6

*T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la caja.

7.3.5.2. Tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μM)

Para medir la actividad enzimática de *P. ostreatus* (CP-754) en el tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μM) se realizó un diseño experimental completamente al azar. Al tratamiento 1 y a su blanco (sin inóculo), se les midió el pH del medio de cultivo empleado a tiempo inicial y tiempo final de la cinética. Se realizaron 3 repeticiones en ambos casos en cada toma de muestra. Se determinó la actividad de lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas en toda la cinética (Figura 10).

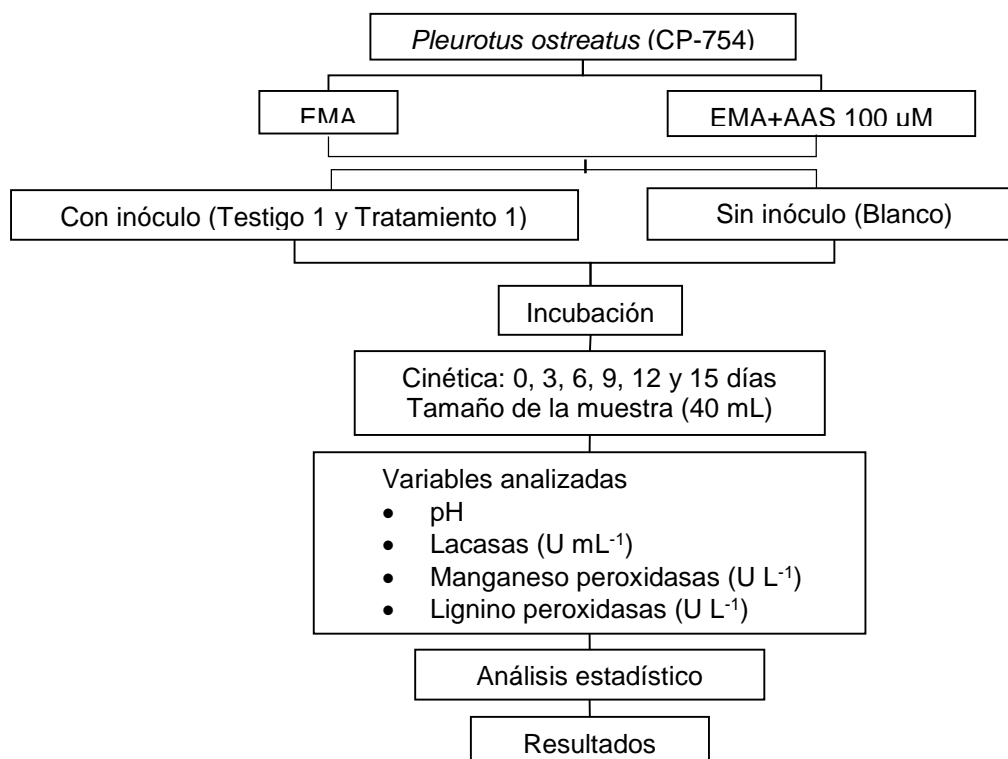


Figura 10. Caracterización enzimática de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en presencia de AAS 100 μM (Tratamiento 1) y con EMA (Testigo) en comparación con el blanco.

7.3.5.3. Toma de muestras durante la cinética

Las muestras se tomaron en el día 0 cuando se colocó el inóculo en las cajas Petri, y posteriormente a los 3, 5, 9, 12 y 15 días de incubación. Se tomaron muestras de 3 cajas Petri al tratamiento 1 y testigo 1. En cada tiempo de toma de muestra se determinó el pH y se procedió a obtener el sobrenadante de las muestras.

7.3.5.4. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras

Dentro de la campana de flujo laminar se colocó todo el contenido de la caja de Petri (40 mL) en un vaso de acero inoxidable de 250 mL estéril y se le agregaron 10 mL de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5, para cada una de las 3 repeticiones del tratamiento, testigo y blancos. El contenido de la caja de Petri se homogeneizó en un homogeneizador Pro 250-Pro Scientific con un rotor estéril de 20 mm x 150 mm a 10 000 rpm hasta su completa homogeneización (Figura 11).

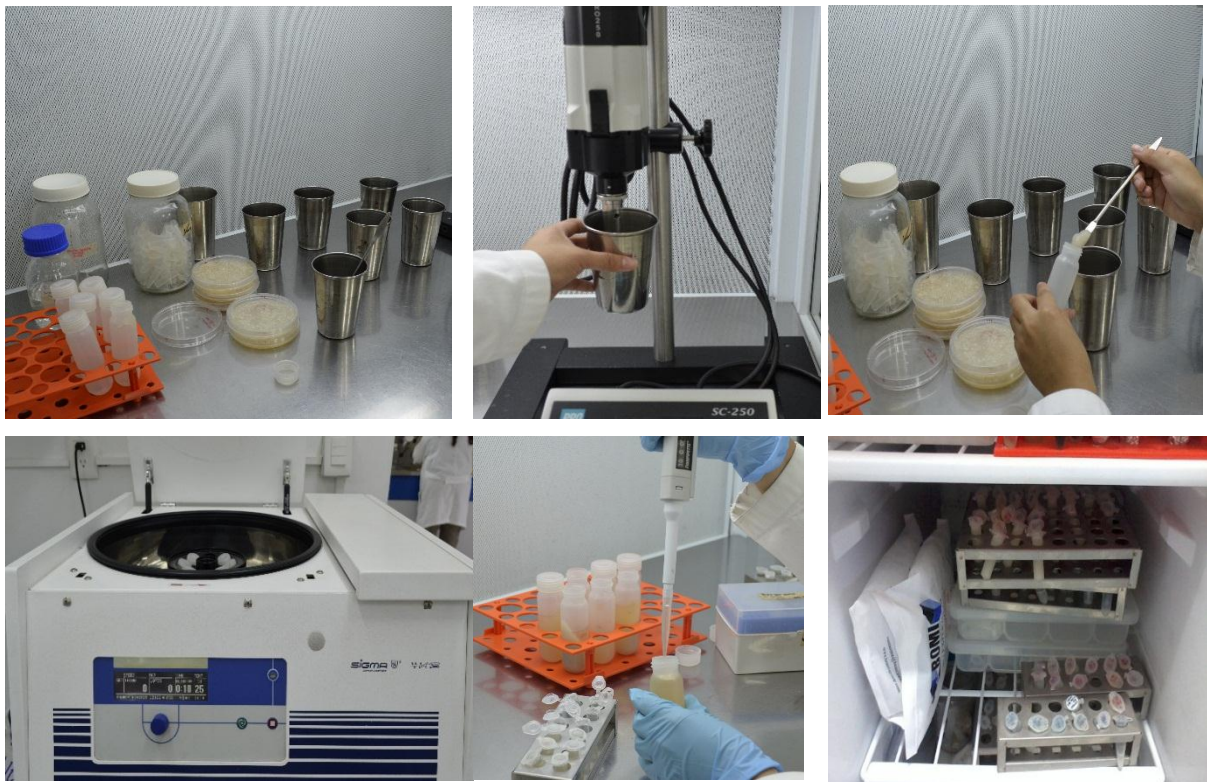


Figura 11. Método para la obtención del sobrenadante de las muestras.

El homogeneizado se colocó en un tubo para centrifuga de 50 mL estéril (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) y se centrifugó a 10 000 rpm a 4° C durante 10 minutos en una centrifuga Sigma 4K15 Laboratory centrifuges. El sobrenadante se recuperó con una pipeta con puntas estériles y se colocó en tubos eppendorf estériles de 2 mL. Las muestras se colocaron en congelación a -2 °C hasta su uso (Figura 11).

7.3.5.5. Tratamiento 2 (EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno)

Para observar la actividad enzimática de *P. ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (tratamiento 2), se realizó un diseño experimental completamente al azar. El tratamiento 2 contó con su blanco el cual se describió en el cuadro 1. Se realizaron 3 repeticiones del tratamiento 1, testigo 1 y blanco. Se determinó el área y velocidad de crecimiento, pH, la actividad de lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas. La figura 12 muestra un diagrama de flujo con los principales pasos realizados en esta parte de la investigación.

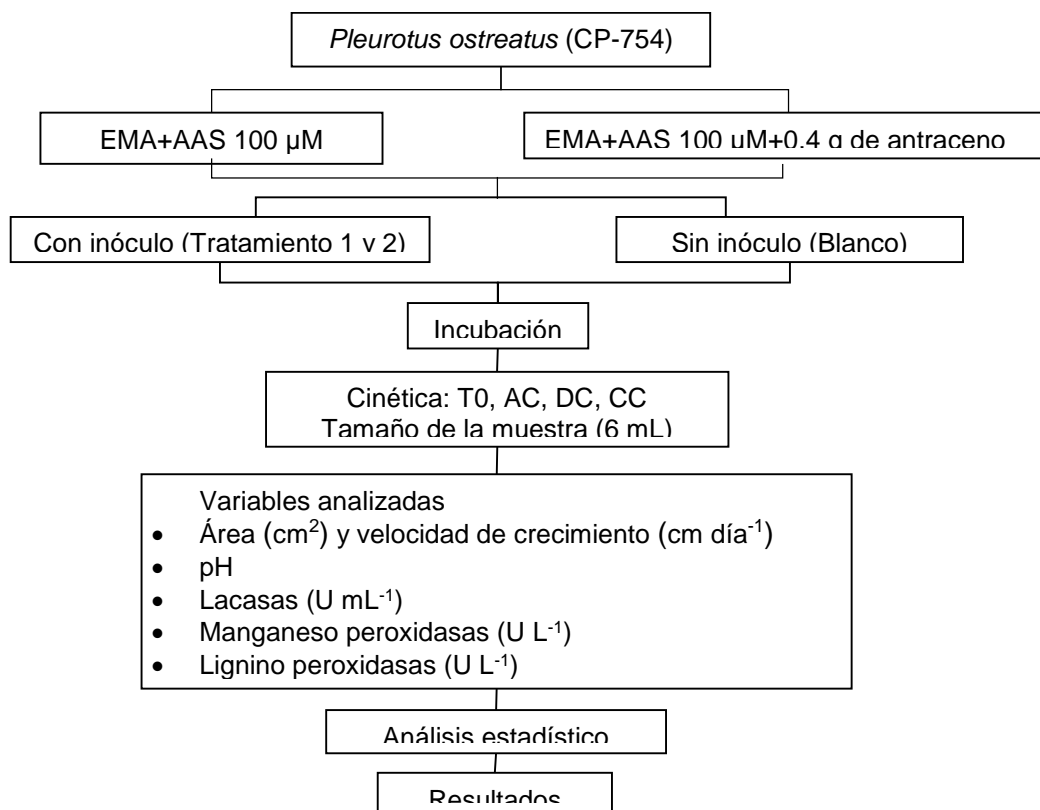


Figura 12. Determinación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en presencia de AAS 100 μ M y 0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).

Se pesaron 0.4 g de antraceno y se empaquetaron en un sobre de papel china. Los sobres con antraceno se esterilizaron a 121°C por 25 min. Una vez esterilizado el antraceno se dejó enfriar hasta su uso. En campana de flujo laminar se cubrieron con papel celofán estéril la mitad de la caja de Petri con medio de cultivo EMA+AAS 100 µM. Cubierta la mitad de la caja de Petri se distribuyó el antraceno estéril en la otra mitad del agar sin papel celofán. Después de colocar el antraceno se retiró cuidadosamente el papel celofán con una pinza estéril, el área sin antraceno quedó disponible para inocularse con la cepa de estudio. El inóculo se colocó cerca de la pared de la caja para que la colonia pudiera crecer y tener mayor área de contacto cuando alcance el antraceno que se colocó en el extremo de la caja.

7.3.5.6. Toma de muestra en base al crecimiento de *P. ostreatus* en presencia de antraceno

La toma de muestra se basó en la propuesta por Camacho-Martínez (2013). Este muestreo se basó en los momentos en que la colonia iba creciendo hacia el antraceno. Se empezó con el tiempo 0, que fue el día de la inoculación, el tiempo antes del contacto o de tocar el antraceno (AC), el tiempo después del contacto (DC) llevando 1 cm invadido el antraceno y el tiempo de colonización completa (CC). Cuando el micelio creció sobre el antraceno y colonizó toda la caja (CC), la toma de muestra se realizó en dos partes de la caja. Una del lado de la colonia en donde se colocó el inóculo, indicada como CC- y, el otro extremo de la caja que fue cuando la colonia cubrió el antraceno, indicada como CC+ (Figura 13).

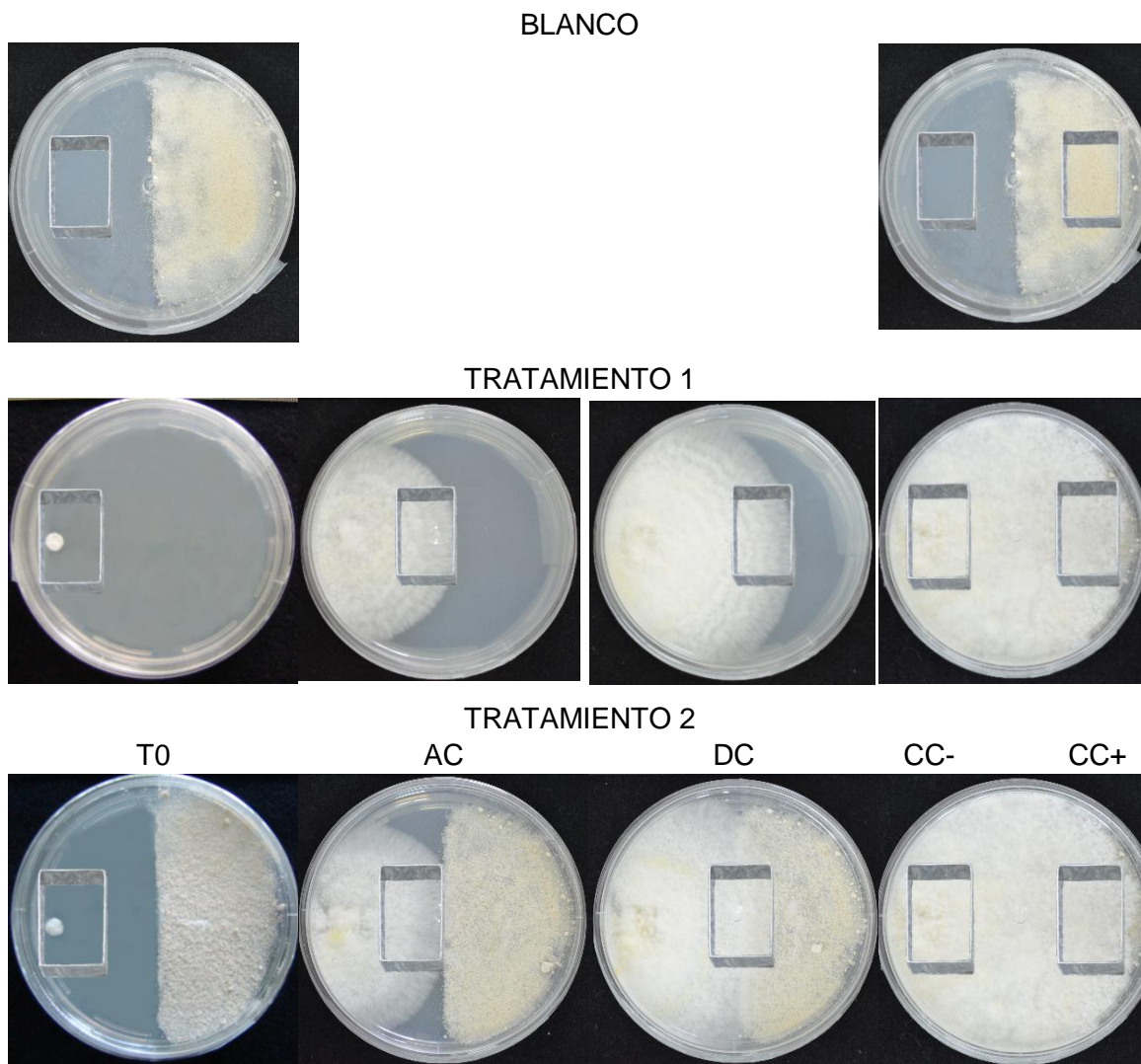


Figura 13. Toma de muestras en base al crecimiento de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1), EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2), EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno sin inóculo (Blanco). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno.

7.3.5.7. Obtención y conservación del sobrenadante de la muestra

A cada momento del crecimiento de la colonia se tomaron alícuotas de 6 mL de cada réplica (n=3). La manera en que se tomaron las alícuotas consistió en cortar con un rectángulo de acero inoxidable estéril una parte del agar, según las condiciones del experimento (Figura 13). Dentro de la campana de flujo laminar se colocó el rectángulo de agar de 6 mL en un vaso de acero inoxidable de 250 mL estéril y se le agregaron 3

mL de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5, el procedimiento se realizó para las 3 repeticiones de cada tratamiento, testigo y blancos. La muestra se homogenizó en un homogeneizador Pro 250-Pro Scientific con un rotor de 20 mm x 150 mm estéril a 10 000 rpm hasta su completa homogenización. El homogeneizado se transvasó a un tubo para centrifuga de 50 mL estéril (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) y se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrifuga Sigma 4K15 Laboratory centrifuges. El sobrenadante también se recuperó con una pipeta automática con puntas estériles y se colocó en tubos eppendorf estériles de 2 mL. Las muestras se almacenaron en congelación a -2 °C hasta su uso.

7.4. Resultados

7.4.1. Testigo 1 versus Tratamiento 1

7.4.1.1. pH

En el cuadro 3 se muestra la cinética de pH de *P. ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA en presencia de AAS 100 μ M, se observó un incremento progresivo a lo largo de la cinética tanto en el pH del testigo (sin AAS) y el tratamiento (AAS 100 μ M) así como una diferencia entre los tratamientos. Los resultados mostraron que el tratamiento no presentó diferencia significativamente de pH comparado con el testigo 1 ($P \leq 0.05$) a lo largo de la cinética.

Cuadro 3. pH de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (testigo 1) y con AAS 100 μ M (tratamiento 1).

Tiempo de incubación (días)	Testigo 1	Tratamiento 1
0	4.919 \pm 0.002 f*	4.971 \pm 0.003 e
3	4.984 \pm 0.011 e	5.012 \pm 0.001 de
6	4.988 \pm 0.005 e	4.985 \pm 0.003 e
9	5.017 \pm 0.006 de	5.035 \pm 0.005 d
12	5.1 \pm 0.006 c	5.173 \pm 0.013 b
15	5.242 \pm 0.015 a	5.282 \pm 0.02 a

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 el pH del testigo fue de 4.919 hasta alcanzar un pH de 5.242 después de 15 días de incubación, lo que representó un incremento del 0.123. El pH del tratamiento 1 en el tiempo 0 fue de 4.971 y al final de la cinética presentó un pH de 5.282 lo que correspondió a un incremento de 0.311. A los 15 días de incubación no se presentó diferencia significativa entre el testigo 1 y el tratamiento 1, por lo que la presencia del AAS no representó algún efecto en el pH de *P. ostreatus* (Figura 14).

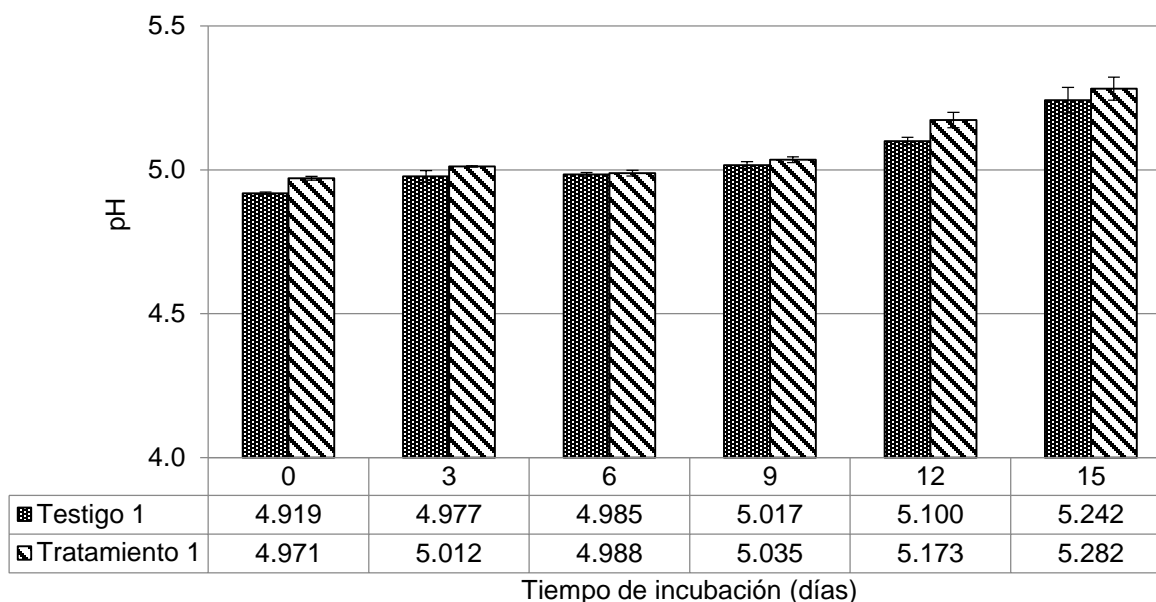


Figura 14. pH de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1).

7.4.1.2. Actividad de lacasas

En el cuadro 4 se observa la actividad de lacasas de *P. ostreatus* (CP-754) en el testigo y en el tratamiento. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 0.99$. Los resultados mostraron que el tratamiento 1 tuvo significativamente ($P \leq 0.05$) mayor actividad de lacasas comparado con el testigo a lo largo de la cinética (Anexo 1).

Cuadro 4. Actividad de lacasas ($U mL^{-1}$) de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y con AAS 100 μ M (Tratamiento 1).

Tiempo de incubación (días)	Blanco	Testigo 1	Tratamiento 1
0	0	0.078 \pm 0.020 f	-0.096 \pm 0.029 f
3		0.370 \pm 0.030 e	0.627 \pm 0.014 f
6		2.741 \pm 0.132 ef	8.833 \pm 0.576 d
9		6.612 \pm 0.628 de	23.814 \pm 1.300 c
12		11.425 \pm 0.262 d	42.594 \pm 0.731 b
15	0	19.735 \pm 0.702 c	88.653 \pm 2.689 a

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 6 se observó un incremento en la actividad de lacasas, donde el tratamiento 1 presentó 6.092 U mL⁻¹ más que el testigo 1, en el día 9 se presentó una diferencia significativa (P≤0.05) entre el tratamiento 1 y el testigo 1, donde el tratamiento 1 (23.814 U mL⁻¹) tuvo 17.202 U mL⁻¹ más que el testigo 1 (6.612 U mL⁻¹), en el día 12 se presentó una diferencia significativa (P≤0.05) entre el tratamiento 1 y el testigo 1, ya que el tratamiento 1 (42.594 U mL⁻¹) presentó 31.169 U mL⁻¹ más que el testigo 1 (11.425 U mL⁻¹). En el punto final de la cinética que correspondió al día 15 se observó un notable incremento de actividad en el tratamiento 1 (88.653 U mL⁻¹), se obtuvieron 68.918 U mL⁻¹ más que el testigo 1 (19.735 U mL⁻¹). Se observó un incremento proporcional conforme al tiempo de incubación y un incremento en la diferencia entre el testigo 1 y el tratamiento 1 (Figura 15).

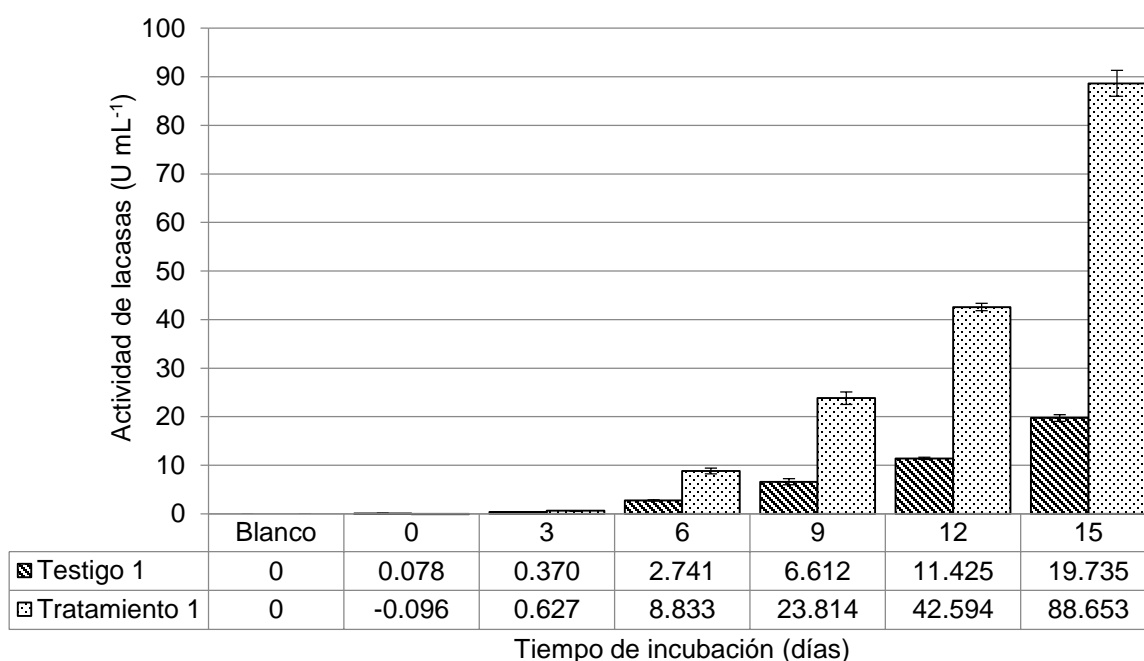


Figura 15. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 µM (Tratamiento 1) (n=3).

7.4.1.3. Actividad de manganeso peroxidasas

En el cuadro 5 se observa la actividad de MnP de *P. ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 µM (Tratamiento 1). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y R^2

0.99. Los resultados mostraron que el tratamiento 1 tuvo significativamente ($P \leq 0.05$) mayor actividad enzimática de MnP comparado con el testigo a lo largo de la cinética (Anexo 2).

Cuadro 5. Actividad de MnP ($U L^{-1}$) de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1).

Tiempo de incubación (días)	Blanco	Testigo 1	Tratamiento 1
0	0	-0.048±0.012 f	-0.031±0.019 ef
3		0.145±0.010 d	0.118±0.005 d
6		0.033±0.002 e	0.161±0.009 d
9		0.152±0.004 d	0.460±0.024 b
12		0.375±0.008 c	0.521±0.023 b
15	0	0.365±0.018 c	0.631±0.009 a

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 3 no hubo diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento pero comparado con el tiempo 6 bajó la actividad del testigo 1. Al igual que las lacasas en el tiempo 6 se comenzó a observar un incremento en la actividad de MnP, donde el tratamiento 1 ($0.161 U L^{-1}$) tuvo $0.128 U L^{-1}$ más que el testigo ($0.033 U L^{-1}$), en el día 9 se presentó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el tratamiento 1 y el testigo 1, donde el tratamiento 1 ($0.460 U L^{-1}$) presentó $0.308 U L^{-1}$ más que el testigo ($0.152 U L^{-1}$), en el día 12 se presentó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el tratamiento 1 y el testigo 1, donde el tratamiento 1 ($0.521 U L^{-1}$) presentó $0.146 U L^{-1}$ más que el testigo 1 ($0.375 U L^{-1}$). Al tiempo final de la cinética que correspondió al día 15 se mantuvo el incremento de la actividad enzimática presentando una diferencia significativa entre ambas condiciones, en donde el tratamiento 1 ($0.631 U L^{-1}$) presentó $0.416 U L^{-1}$ más que el testigo 1 ($0.365 U L^{-1}$), el testigo no presentó un incremento significativo con respecto al testigo en el día 12. Se observó un incremento proporcional conforme al tiempo de incubación y un incremento en la diferencia entre el testigo y el tratamiento (Figura 16).

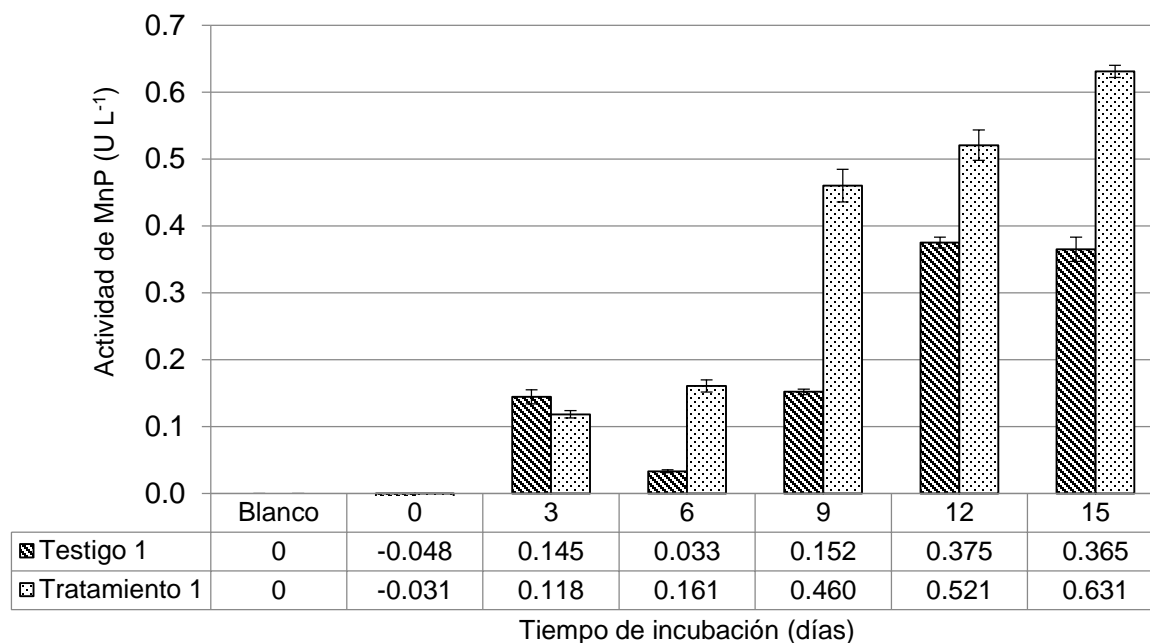


Figura 16. Actividad de MnP de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).

7.4.1.4. Actividad de lignino peroxidasas

En el cuadro 6 se observa la actividad de LiP de *P. ostreatus* (CP-754) en el testigo y en el tratamiento. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.001$ y $R^2 = 0.99$. El incremento en la actividad de LiP fue constante a lo largo de la cinética tanto para el testigo como para el tratamiento. El tratamiento 1 con AAS tuvo significativamente ($P \leq 0.05$) mayor actividad de LiP comparado con el testigo 1 a lo largo de la cinética (Anexo 3).

Cuadro 6. Actividad de LiP ($U L^{-1}$) de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1).

Tiempo de incubación (días)	Blanco	Testigo 1	Tratamiento 1
0	0	0.035 \pm 0.003 e	0.108 \pm 0.016 e
3		0.141 \pm 0.035 e	0.070 \pm 0.010 e
6		0.638 \pm 0.021 e	1.651 \pm 0.163 d
9		1.962 \pm 0.115 d	1.997 \pm 0.063 d
12		2.315 \pm 0.158 cd	2.821 \pm 0.191 c
15	0	4.790 \pm 0.104 b	5.773 \pm 0.296 a

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Se observó el mismo patrón de actividad que en lacasas y MnP, en el tiempo 6 presentó un incremento en la actividad de LiP, donde el tratamiento 1 (1.651 U L⁻¹) fue 1.013 U L⁻¹ mayor que el testigo 1 (0.638 U L⁻¹), en el día 9 no hubo diferencia significativa (P≤0.05) entre el tratamiento 1 y el testigo 1, en el día 12 no se presentó una diferencia significativa (P≤0.05) entre el tratamiento 1 y el testigo 1, donde el tratamiento 1 (2.821U L⁻¹) fue 0.506 U L⁻¹ mayor que el testigo 1 (2.315 U L⁻¹). En el tiempo final de la cinética que corresponde al día 15 se observó una diferencia significativa entre el tratamiento 1 y el testigo 1, en donde el tratamiento 1 (5.773 U L⁻¹) tuvo 0.983 U L⁻¹ más que el testigo 1 (4.790 U L⁻¹). Se observó un incremento proporcional conforme al tiempo de incubación, pero no se observó una diferencia significativa entre el tratamiento 1 y el testigo 1, solo al final de la cinética se presentó una diferencia significativa y una mayor actividad de LiP (Figura 17).

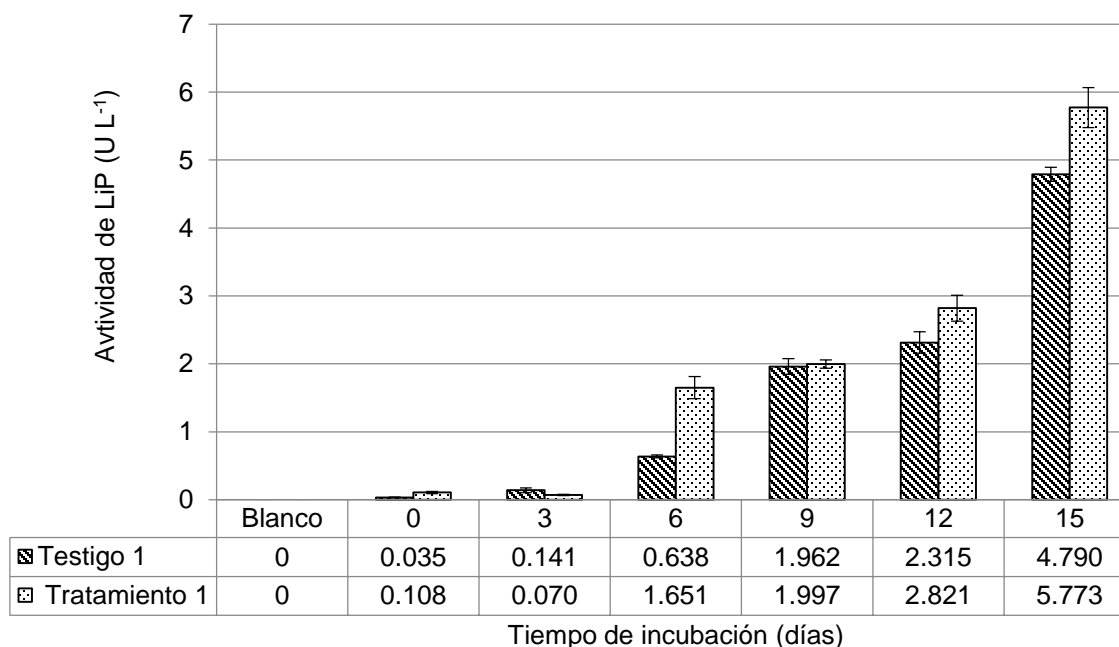


Figura 17. Actividad de LiP de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1) y EMA+AAS 100 µM (Tratamiento 1) (n=3).

7.4.2. Tratamiento 1 versus Tratamiento 2

En la figura 18 se observa el crecimiento del micelio en los diferentes tiempo de toma de muestra de *P. ostreatus* (CP-754) en presencia de 0.4 g de antraceno (tratamiento 2) y sin antraceno (tratamiento 1). En el tratamiento 1 y 2 se observan los lugares en donde se tomó la muestra de agar de cada réplica, de las cuales se obtuvo el sobrenadante. El tratamiento 2 en el tiempo antes del contacto (AC) se observó una colonia joven que no colonizó toda la superficie de agar de cada réplica, en el tiempo DC se observó como el micelio hizo contacto con el antraceno y en el tiempo CC se observó como el micelio colonizó por completo toda la superficie de la caja de Petri. Comparado este comportamiento con el micelio desarrollado en el tratamiento 1 se puede observar que la colonia presentó el mismo desarrollo que la colonia expuesta al antraceno, por lo que el antraceno no inhibió el crecimiento de la colonia.

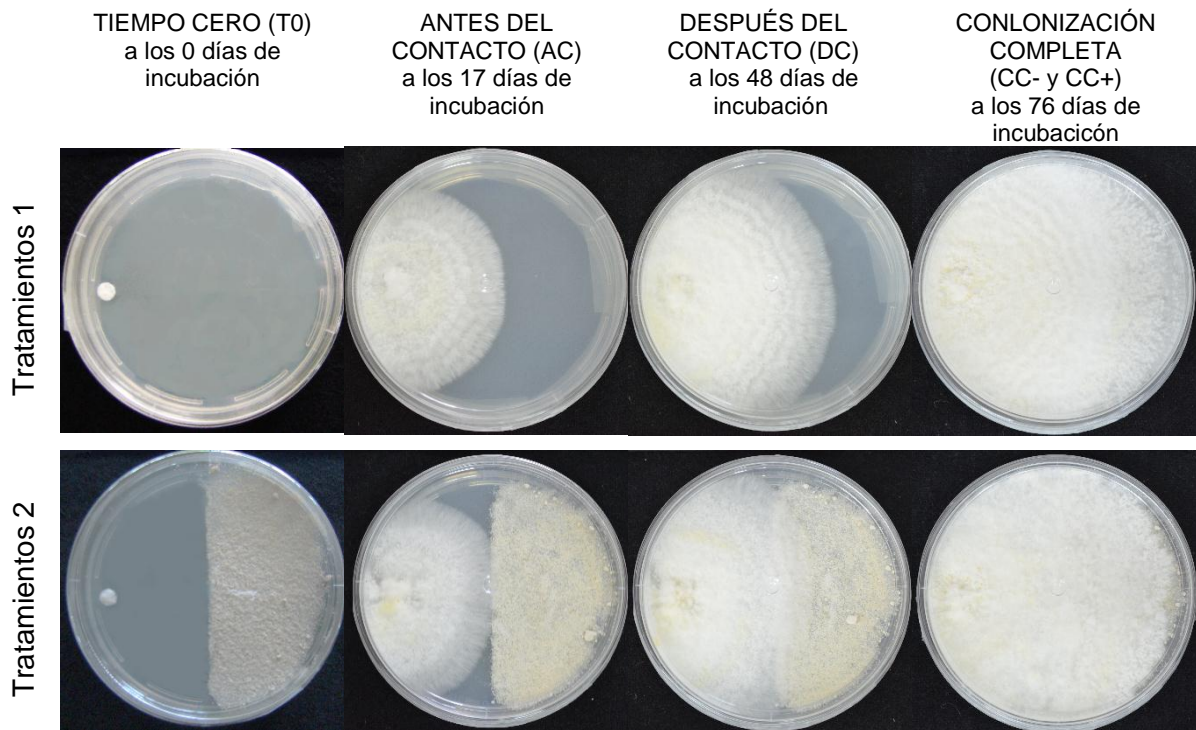


Figura 18. Crecimiento de la colonia de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno.

7.4.2.1. Área y velocidad de crecimiento

En la figura 19 se observa el área de crecimiento de *P. ostreatus* (CP-754) en el tratamiento 1 y tratamiento 2, donde el área de crecimiento fue mayor en el tratamiento 1 (sin antraceno) al término de la cinética presentó un área de 64.979 cm². En el tratamiento 2 el área de crecimiento fue menor a lo largo de la cinética, al final presentó un área de 64.907 cm².

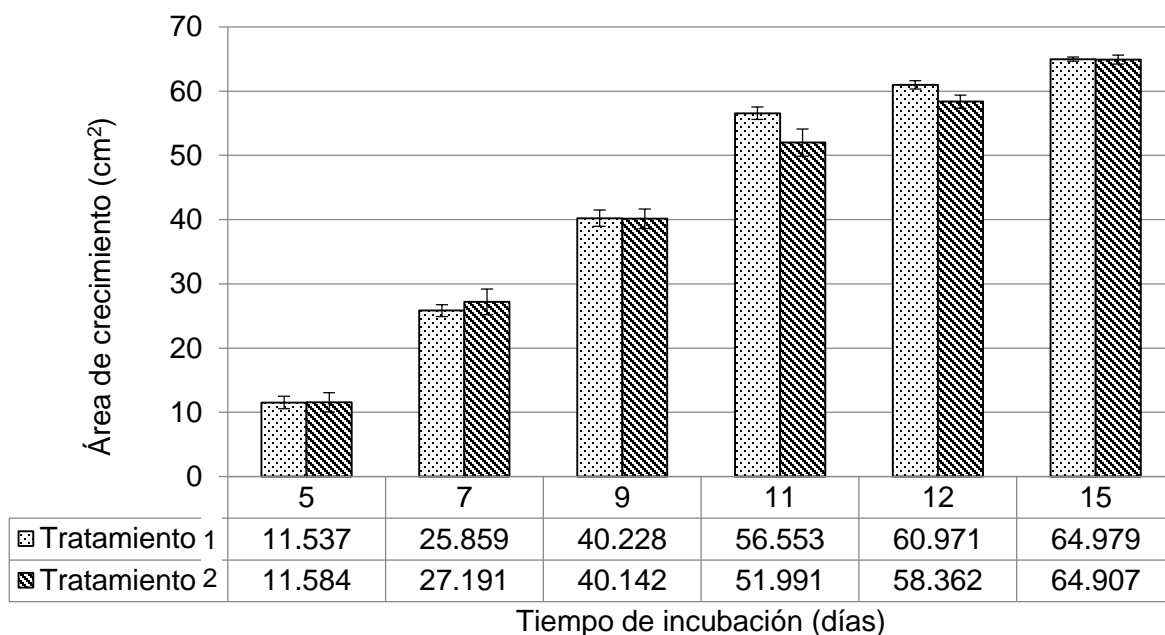


Figura 19. Área de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 µM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2) (n=3).

En la figura 20 se observa la velocidad de crecimiento de *P. ostreatus* (CP-754) en el tratamiento 1 y tratamiento 2. A los 15 días de incubación el micelio colonizó toda la caja de Petri. No se presentó diferencia significativa entre el tratamiento 1 y 2 a lo largo de la cinética. A los 9 días de incubación disminuyó la velocidad del tratamiento 2 con respecto al tratamiento 1, en este momento de la cinética el micelio entró en contacto con el antraceno, manteniéndose esta diferencia hasta el término de la cinética.

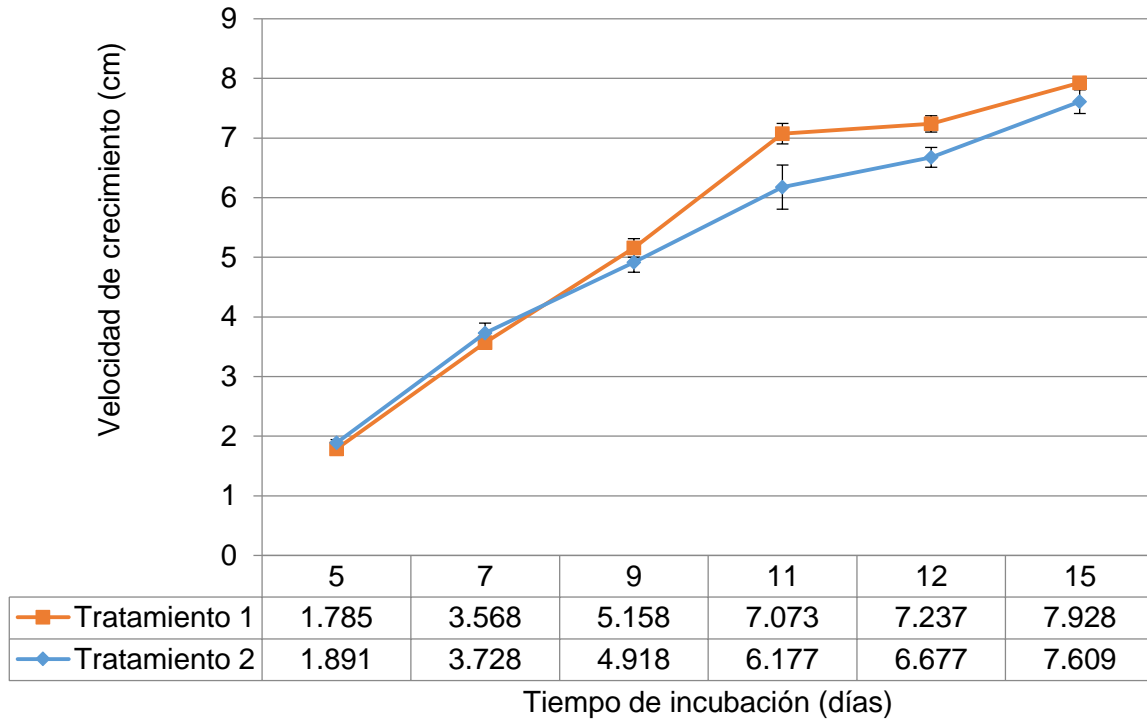


Figura 20. Velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2) (n=3).

7.4.2.2. pH

En el cuadro 7 se muestra el pH de *P. ostreatus* (CP-754) en tratamiento 1 y 2, en donde el pH del tratamiento 1 aumentó a lo largo de los diferentes tiempos de toma de muestra y el pH del tratamiento 2 disminuyó. El análisis de varianza indicó una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.001$ y $R^2 0.97$. Se presentó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el tratamiento 1 y el tratamiento 2 en el T0 y AC y, en los tiempos posteriores fueron significativamente diferentes ambas condiciones. Entre tiempos hubo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) a lo largo de la cinética. El pH del tratamiento fue mayor que el testigo a lo largo de todos los tiempos de toma de muestra aunque en algunos tiempos no presentó una diferencia significativa (Anexo 4).

Cuadro 7. pH de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).

Muestreo y tiempo incubación	Blanco	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Tiempo 0	0	4.921±0.004 d*	5.9±0.003 a
Tiempo AC (7 días)		4.953±0.002 d	5.737±0.052 ab
Tiempo DC (9 días)		4.957±0.008 d	5.602±0.003 bc
Tiempo CC (15 días)	0	5.51±0.084 c	5.514±0.036 c

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 el pH del tratamiento 1 fue de 4.921 y el tratamiento 2 de 5.9; en el tiempo AC el pH del tratamiento 1 fue de 4.953 y el del tratamiento 2 de 5.737, en el tiempo DC el pH del tratamiento 1 fue de 4.957 y el pH del tratamiento 2 de 5.602, en el tiempo CC el pH del tratamiento 1 no presentó diferencia significativa con respecto a tratamiento 2 siendo el pH del testigo de 5.51 y del tratamiento 2 de 5.514, apenas con una diferencia del 0.4 (Figura 21).

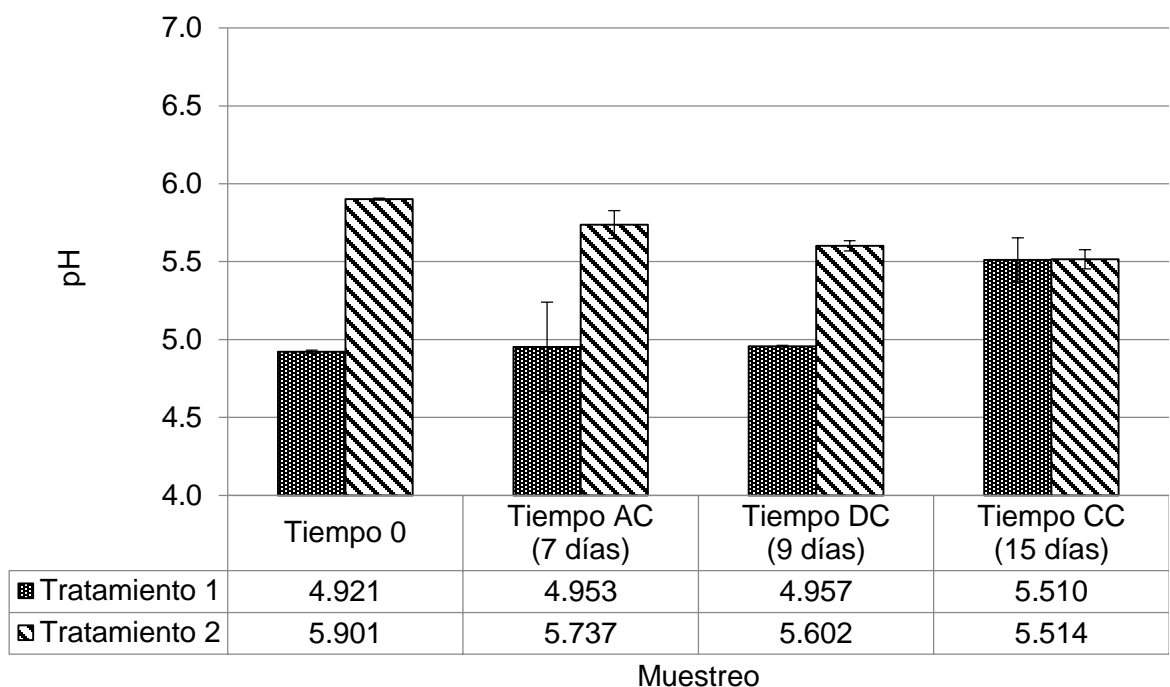


Figura 21. pH de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC= Colonización completa de la colonia (n=3).

7.4.2.3. Actividad de lacasas

En el cuadro 8 se presenta la actividad de lacasas de *P. ostreatus* (CP-754) para los tratamientos 1 y 2, se realizó una cinética de la actividad enzimática en diferentes tiempos en donde el micelio se encuentra en presencia del antraceno. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.001$ y $R^2 = 0.96$. No se presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos 1 y 2 en los diferentes tiempos de toma de muestra. Sin embargo, si se observó diferencia entre los tiempos de muestro, presentándose en el tiempo CC- mayor actividad de lacasas que en los demás tiempos (Anexo 5).

Cuadro 8. Actividad de lacasas ($U\ mL^{-1}$) de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS $100\ \mu M$ (Tratamiento 1) y EMA+AAS $100\ \mu M + 0.4\ g$ de antraceno (Tratamiento 2).

Muestreo y tiempo de incubación	Blanco	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Tiempo 0	0	0.049±0.022 d	0.059±0.019 D
Tiempo AC (7 días)		4.33±0.019 bc	5.974±0.131 B
Tiempo DC (9 días)		1.984±0.015 cd	4.674±0.569 BC
Tiempo CC - (15 días)		11.134±0.516 a	12.487±1.625 A
Tiempo CC + (15 días)	0	5.842±0.23 b	6.529±0.178 B

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 la actividad de lacasas fue de 0; en el tiempo AC no hubo diferencia significativa entre el tratamiento 1 ($4.33\ U\ mL^{-1}$) y el tratamiento 2 ($5.974\ U\ mL^{-1}$), pero el tratamiento 2 presentó $1.64\ U\ mL^{-1}$ más unidades que el testigo; en el tiempo DC no se presentó diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero el tratamiento 2 ($4.674\ U\ mL^{-1}$) presentó $2.7\ U\ mL^{-1}$ unidades que el tratamiento 1 ($1.984\ U\ mL^{-1}$); en el tiempo CC- no se observó diferencia significativa entre los tratamiento 1 y 2, pero el tratamiento 2 con $12.487\ U\ mL^{-1}$ fue mayor que el tratamiento 1 ($11.134\ U\ mL^{-1}$) y, en el tiempo CC+ no hubo diferencia significativa entre el ambos tratamientos, aunque el tratamiento 2 fue $0.69\ U\ mL^{-1}$ mayor que el tratamiento 1 ($5.842\ U\ mL^{-1}$). En el tiempo de colonización completa se observó una diferencia significativa entre el CC- y CC+ tanto en el testigo como en el tratamiento. La mayor la actividad de lacasas se presentó en el tiempo CC-, cuando el micelio presentó mayor desarrollo y estuvo en contacto con los $0.4\ g$. de antraceno (Figura 22).

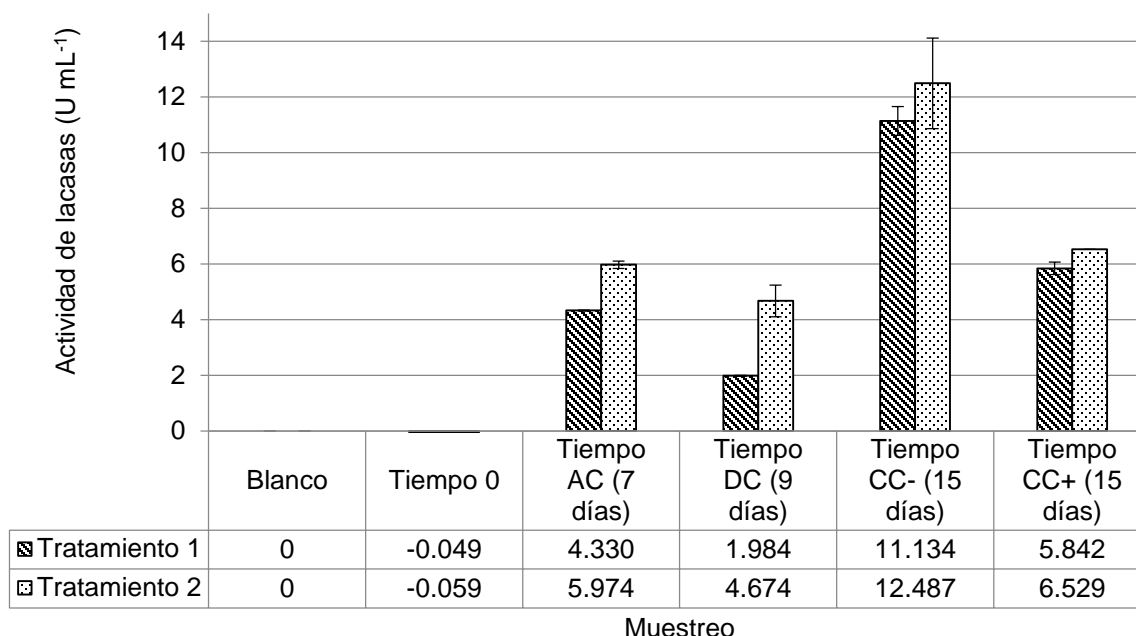


Figura 22. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).

7.4.2.4. Actividad de manganeso peroxidasas

En el cuadro 9 se presenta la actividad de MnP de *P. ostreatus* (CP-754) obtenida en los tratamientos 1 y 2. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y R^2 0.92. No se observó diferencia significativa entre el tratamiento 2 y el tratamiento 1 a lo largo de la cinética, sin embargo, si se presentó diferencia entre los tiempos de muestro, en donde en el tiempo CC se presentó mayor actividad de MnP que en los demás tiempos (Anexo 6).

Cuadro 9. Actividad de MnP (U L^{-1}) de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).

Muestreo y tiempo incubación	Blanco	Tratamiento 1		Tratamiento 2	
Tiempo 0	0	0.022±0.014	b*	0.023±0.032	b
Tiempo AC (7 días)		0.085±0.023	b	0.067±0.011	b
Tiempo DC (9 días)		0.0713±0.021	b	0.0923±0.032	b
Tiempo CC - (15 días)		0.318±0.013	a	0.388±0.044	a
Tiempo CC + (15 días)	0	0.262±0.024	a	0.334±0.038	a

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 la actividad de MnP fue de 0.022 U L⁻¹ en el tratamiento 1 y 2; en el tiempo AC no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, pero el tratamiento 1 con 0.085 U L⁻¹ fue ligeramente mayor que el tratamiento 2 (0.067 U L⁻¹); en el tiempo DC no hubo diferencia significativa entre tratamientos, pero el tratamiento 2 (0.092 U L⁻¹) fue 0.021 U L⁻¹ mayor que el tratamiento 1 (0.071 U L⁻¹), en el tiempo CC- no hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero el tratamiento 2 (0.388 U L⁻¹) presento 0.07 U L⁻¹ más unidades que el tratamiento 1 (0.318 U L⁻¹) y, en el tiempo CC+ se presentó diferencia significativa entre tratamientos. En el tiempo de colonización completa no se observó una diferencia significativa entre el CC- y CC+. La mayor actividad enzimática se presentó en el tratamiento del tiempo CC-, donde el micelio se observó más desarrollado y en presencia del antraceno, por lo que cuando estuvo el micelio en contacto con el antraceno fue mayor la actividad de MnP (Figura 23).

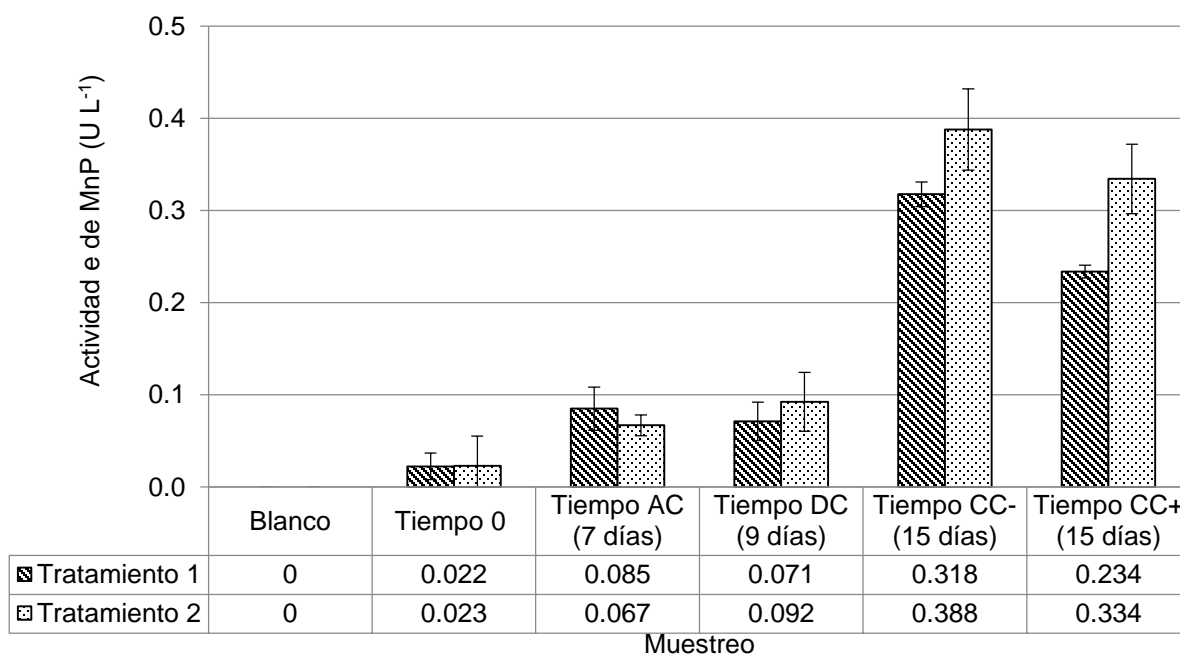


Figura 23. Actividad de MnP de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 µM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).

7.4.2.5. Actividad de lignino peroxidasas

En el cuadro 10 se presenta la actividad de lignino peroxidasas de *P. ostreatus* (CP-754) en los tratamientos 1 y 2, se realizó una cinética de la actividad enzimática en los puntos donde el micelio se encontró en presencia del antraceno. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 = 0.99$. Solo se observó diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 en el tiempo CC+ y, entre los tiempos de muestro, en donde el tiempo CC- y CC+ presentó una diferencia significativa y mayor que en los demás tiempos (Anexo 7).

Cuadro 10. Actividad de LiP de ($U L^{-1}$) de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno (Tratamiento 2).

Muestreo y tiempos de incubación	Blanco	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Tiempo 0	0	-0.071±0.066 f*	0.06±0.036 ef
Tiempo AC (7 días)		0.244±0.073 de	0.107±0.032 def
Tiempo DC (9 días)		0.104±0.027 def	0.368±0.044 d
Tiempo CC - (15 días)		2.58±0.006 a	2.582±0.008 a
Tiempo CC + (15 días)	0	1.751±0.121 b	0.914±0.024 c

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 la actividad de LiP fue de $0.07 U L^{-1}$ en el tratamiento 1 y $0.06 U L^{-1}$ en el tratamiento 2; en el tiempo AC no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, pero el tratamiento 1 presentó $0.137 U L^{-1}$ unidades más que el tratamiento 2 ($0.107 U L^{-1}$); en el tiempo DC no se presentó diferencia significativa entre ambos tratamientos, aunque el tratamiento 2 con $0.368 U L^{-1}$ fue $0.264 U L^{-1}$ mayor que el tratamiento 1 ($0.104 U L^{-1}$), en el tiempo CC- no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2, presentando ambos $2.58 U L^{-1}$ y en el tiempo CC+ no hay diferencia significativa entre los tratamientos, observando que el tratamiento 1 con $1.751 U L^{-1}$ contó con $0.837 U L^{-1}$ unidades más que el tratamiento 2 ($0.914 U L^{-1}$). En el tiempo de colonización completa se observó una diferencia significativa entre el CC- y CC+. La mayor actividad enzimática se presentó en el tratamiento 1 y tratamiento 2 del tiempo CC-, donde el micelio se encuentra más desarrollado, indistintamente si está en presencia del antraceno, por lo que fue mayor la actividad enzimática de LiP cuando el micelio estuvo más desarrollado (Figura 24).

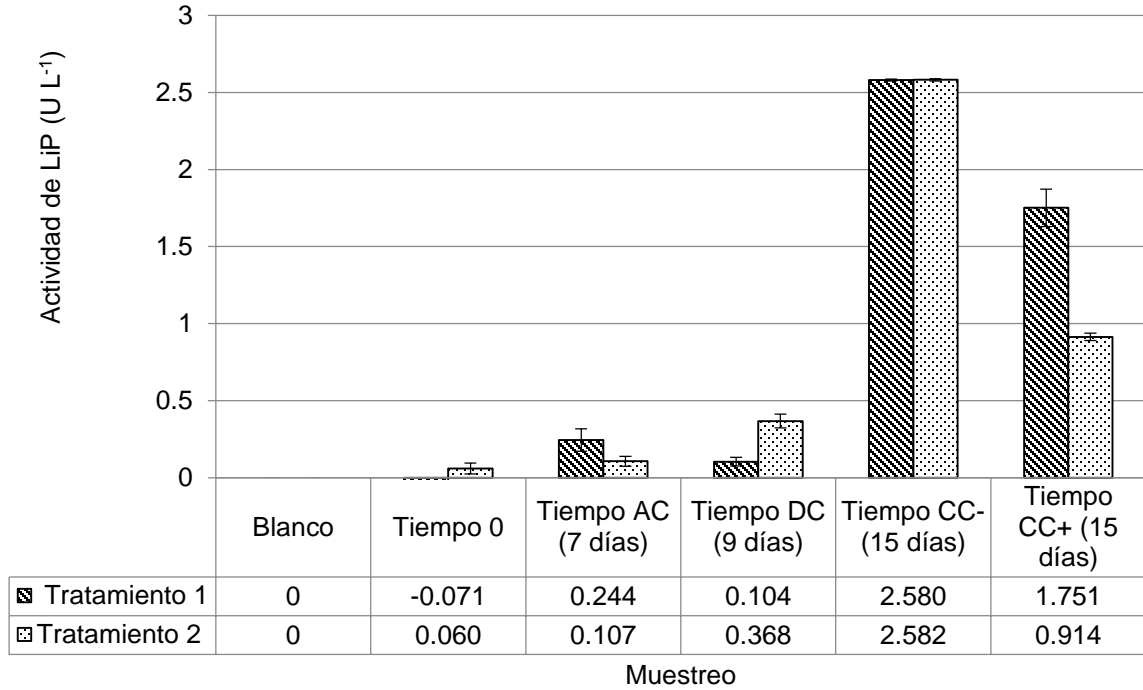


Figura 24. Actividad de LiP de *Pleurotus ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) y EMA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 2). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).

7.5. Discusión

La actividad enzimática estuvo influenciada por la cepa de estudio, temperatura, pH, medio de cultivo y condiciones de cultivo en general. Por otro lado, la presencia de algunos compuestos metálicos como el manganeso, Cu, ha sido reportada para mejorar la actividad biocatalítica en hongos de podredumbre blanca sobre la degradación de la lignocelulosa de subproductos agroindustriales (Rangel, 2012). Actualmente los estudios sobre el efecto de AAS están enfocados a las plantas y no se ha ahondado en los posibles efectos en hongos comestibles.

Los hongos del género *Pleurotus* presentan una mayor actividad de lacasas en comparación con otros géneros de hongos. *Pleurotus ostreatus* (CP-50) presenta una actividad de lacasas de 4000 U mL⁻¹, *Pleurotus pulmonaris* (CP-267) de 2500 mL⁻¹ y *Pleurotus levis* (CP-30) 1000 U mL⁻¹, estas cepas fueron cultivadas en medio EMB adicionado con cobre (Spezzia, 2012).

En base a lo anterior la presente investigación evaluó la actividad enzimática de cepas del género *Pleurotus* entre ellas la cepa de *P. ostreatus* (CP-754). A diferencia de los estudios de Spezzia (2012), se evaluó el efecto del AAS como potencializador de la actividad enzimática de lacasas, MnP y LiP en medio de cultivo semisólido EMA.

EL pH de *P. ostreatus* en presencia de AAS se mantuvo a lo largo de la cinética en un rango de 4.9 a 5.2, y en presencia de antraceno de 4.9 y 5.9. Según ensayos de Díaz (2009) el pH en *P. ostreatus* afecta la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa, a pH de 4.5, se observa una velocidad específica de crecimiento mayor en comparación con la observada a pH de 6.5 y 8.5. El pH de actividad de lacasas no es el mismo que el pH óptimo de crecimiento del hongo. La máxima actividad de lacasas se observó a un pH de desarrollo de 6.5 a las 432 h de fermentación.

En este trabajo el pH se encontró en un rango aceptable para la actividad enzimática. En presencia de antraceno el pH fue mayor y disminuyó conforme el hongo entró en contacto con el antraceno, lo cual indicó que el antraceno vuelve más básico el medio y la acción enzimática lo acidifica, hasta un pH adecuado para la degradación.

Los resultados de *P. ostreatus* (CP-754) en medio de cultivo semisólido EMA en presencia de AAS 100 µM mostraron un incremento de 349% en la actividad de

lacasas, un 73% en la actividad de MnP y un 22% en la actividad de LiP. Por lo que fue mayor el efecto del AAS en la actividad de lacasas. Este incremento puede deberse a que el AAS es un compuesto fenólico, y es utilizado por *P. ostreatus* como posible sustrato para la actividad de las enzimas (Palmieri, 1997).

También podría considerarse que el AAS se desempeñó como mediador de las lacasas. Los mediadores redox son compuestos de bajo peso molecular, que actúan como intermediarios redox, a partir de los cuales la actividad catalítica de las lacasas puede ser expandida hacia sustratos no fenólicos más difícilmente oxidables, son capaces de reciclarse en sucesivos ciclos de óxido-reducción sin degradarse (Bourbonnais y Paice, 1990), lo que incrementa la actividad enzimática de las lacasas.

Con lo referente a investigaciones sobre *P. ostreatus* en presencia de antraceno, la cepa de *P. ostreatus* (CP-50) cultivada en presencia de antraceno alcanzó un pico máximo de actividad de 28.06 U mL⁻¹, utilizando syringaldazina como sustrato enzimático oxidante; en cambio cuando creció sin antraceno, el pico máximo de actividad se presentó a los 8 días de crecimiento con 25.21 U mL⁻¹, al oxidar al mismo sustrato enzimático (Spezzia, 2012).

Los ensayos realizados por Camacho-Martínez (2013), demostraron que la mayor producción de lacasas se observa en el tratamiento con 0.4 g de antraceno, en la zona después del contacto (DC), obteniendo 32.67 U mL⁻¹, mientras que el testigo presentó 25.07 U mL⁻¹, lo equivalente a 23.3% más de enzima que el testigo. En comparación con lo obtenido en la presente investigación la actividad de lacasas en el tiempo DC fue menor que lo obtenido por Camacho-Martínez (2013), los valores fueron de 2 U mL⁻¹ en el testigo y 4.7 U mL⁻¹ en el tratamiento en el tiempo DC. La mayor actividad enzimática se presentó en el tiempo de colonización completa en la parte opuesta al antraceno (CC-) con 12.5 U mL⁻¹ a diferencia de lo reportado por el mismo autor, en donde la actividad en CC+ fue mayor que CC-. A diferencia de *P. ostreatus* (CP-50) la cepa CP-754 presentó una velocidad de crecimiento mayor que la CP-50 por lo que los tiempos AC, DC y CC, fueron alcanzados antes por la CP-754 utilizada en este trabajo. La CP-50 colonizó por completo la caja de Petri a los 28 días y la CP-754 a los 15 días.

7.6. Conclusiones y perspectivas

El ácido acetil salicílico no influyó en el área de crecimiento y en la velocidad de crecimiento de *P. ostreatus* (CP-754). La velocidad de crecimiento se vio reducida cuando el micelio entró en contacto con el antraceno, debido a la toxicidad del antraceno, pero el hongo mantuvo su capacidad de crecimiento y colonizó toda la caja de Petri aun en presencia de antraceno. La adición de AAS 100 μ M en medio de cultivo semisólido EMA incrementó considerablemente la actividad de lacasas, MnP y LiP. La presencia de antraceno representó un leve estímulo en el incremento de la actividad de lacasas, MnP y LiP.

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron el potencial de *P. ostreatus* (CP-754) para la producción de enzimas con importancia biotecnológica para degradación de contaminantes. Resulta importante realizar estudios sobre los efectos del ácido acetil salicílico (AAS) en la fisiología y el incremento de la actividad enzimática en los hongos, debe enfocarse así el estudio en las ruta enzimática de degradación de la lignina y ampliar el campo de conocimiento de los componentes que interviene en la degradación de los hidrocarburos poliaromáticos del petróleo. Se recomienda realizar un ensayo *in vitro* que permita evaluar la capacidad de los hongos comestibles para tolerar, crecer y producir lacasas en presencia directa de compuestos tóxicos derivados del petróleo en suelo agrícola, que permitan escalar un paso hacia una prueba piloto *in situ* utilizando a *Pleurotus ostreatus* como modelo para biorremediar suelos contaminados por hidrocarburos en México.

VIII. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ENZIMÁTICO DE *Pleurotus levis* (CP-30)

8.1. Resumen

Se estudió a *Pleurotus levis* (CP-30) caracterizando el área y velocidad de crecimiento, el desarrollo micelial, la actividad de lacasas, contenido de proteínas y celulasas, en medio de cultivo semisólido agar con dextrosa papa (PDA) y agar con extracto de malta (EMA) adicionado con AAS 1 μM y 100 μM como posible potencializador de la actividad enzimática. También se determinó el potencial enzimático en medio de cultivo PDA con AAS 100 μM en presencia de 0.4 g de antraceno; y finalmente se analizó el potencial enzimático de *P. levis* (CP-30) en medio PDA con de AAS 100 μM , a los 30 días de incubación se colocaron 0.4 g de antraceno sobre la colonia desarrollada. En presencia de 0.4 g de antraceno la mayor actividad de lacasas se presentó en el tiempo de colonización completa (CC) en la parte opuesta a donde se colocó el antraceno (CC-) la actividad de lacasas fue de 13.634 U mL^{-1} en el tratamiento 7 (PDA+AA 100 μM) y de 42.01 U mL^{-1} en el tratamiento 10 (PDA+AA 100 μM +0.4 g de antraceno). La mayor actividad de MnP se presentó en el tiempo AC con 0.205 U L^{-1} en el tratamiento 7 y de 0.216 U L^{-1} en el tratamiento 10. Por lo que *P. levis* (CP-30) representó un potencial enzimático que es potencializado por la adición del AAS en presencia de 0.4 g de antraceno.

8.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar el desarrollo micelial y la actividad enzimática de *P. levis* (CP-30) en diferentes medios de cultivo y en presencia de diferentes concentraciones de ácido acetil salicílico.
2. Determinar el potencial enzimático de la *P. levis* (CP-30) en presencia de ácido acetil salicílico y de antraceno.

8.3. Materiales y Métodos

8.3.1. Reactivación de *P. levis* (CP-30) en medio de cultivo PDA

Se reactivó la cepa de *P. levis* (CP-30) registrada en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Para lo cual se preparó medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA, DIFCO) según lo indica el fabricante (39 g en 1000 mL), se disolvió a 100 °C y se esterilizó a 121 °C por 25 min. Posteriormente, el medio estéril se vació en cajas de Petri de 60x15 mm y se dejaron gelificar. En la campana de flujo laminar se procedió a cortar con una aguja de disección estéril pequeños fragmentos de micelio de 5 mm de diámetro, los cuales se colocaron en un vaso de acero inoxidable con rotor, se adicionó 1 mL de agua estéril por cada fragmento. Se selló el vaso de acero inoxidable con el rotor y se procedió a homogeneizar las colonias en un homogeneizador Pro 250-ProScientific a 10000 rpm por 30 segundos. Con una pipeta automática y puntas estériles se colocaron 250 μ L del homogeneizado en las cajas Petri con medio de cultivo semisólido PDA. Con una varilla de vidrio estéril se plaqueó la suspensión homogéneamente, las cajas Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente (Figura 25).

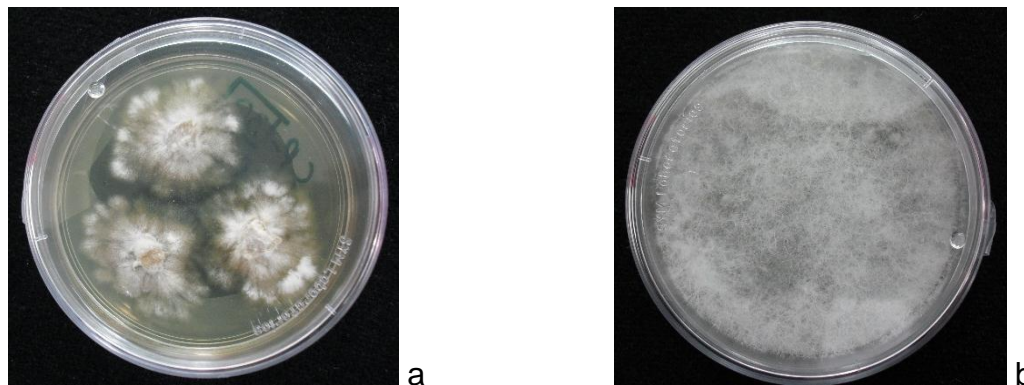


Figura 25. Inóculo de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA. (a=inóculo convencional, b=inóculo homogeneizado).

8.3.2. Preparación de los medios de cultivo

A cada solución se les adicionó por separado la cantidad de medio de cultivo a preparar PDA (BIOXON, 39 g en 1000 mL) y EMA (DIFCO, 33.6 g en 1000 mL). El medio y las soluciones de AAS se calcularon para preparar cajas de Petri con PDA sin AAS, EMA sin AAS, PDA con AAS 1 μ M, EMA con AAS 1 μ M, PDA con AAS 100 μ M,

EMA con AAS 100 μM . Estos tratamientos se sembraron con inóculo convencional y homogeneizado. El cuadro 11 resume las condiciones de los tratamientos propuestos en esta investigación. Tanto a los testigos, como a los tratamientos se les elaboró un blanco, el cual consistió en cajas de Petri sin inocular. Los blancos sirvieron como prueba de esterilización y para determinar el pH inicial y final. La cantidad de medio empleado por caja de Petri fue de 30 mL. Para ello se utilizaron tubos de ensaye con tapa de baquelita y se colocaron 30 mL de medio. Se esterilizaron los tubos a 121°C por 25 min. Los tubos estériles con el medio se vaciaron en cajas Petri de 100x15 mm y se dejaron gelificar.

Cuadro 11. Descripción de la manera que se definieron las condiciones del experimento, la siembra y los tratamientos para la cepa de *Pleurotus levis* (CP-30)*.

Muestra	Tipo de inóculo	Condiciones de cultivo	Tamaño de la muestra (mL)
Testigo 1	Convencional	EMA	30
Testigo 2	Homogeneizado	EMA	30
Testigo 3	Convencional	PDA	30
Testigo 4	Homogeneizado	PDA	30
Tratamiento 1	Convencional	EMA+AAS 100 μM	30
Tratamiento 3	Homogeneizado	EMA+AAS 100 μM	30
Tratamiento 4	Convencional	EMA+AAS 1 μM	30
Tratamiento 5	Homogeneizado	EMA+AAS 1 μM	30
Tratamiento 6	Convencional	PDA+AAS 100 μM	30
Tratamiento 7	Homogeneizado	PDA+AAS 100 μM	40, 30 y 6
Tratamiento 8	Convencional	PDA+AAS 1 μM	30
Tratamiento 9	Homogeneizado	PDA+AAS 1 μM	30
Tratamiento 10	Homogeneizado	PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno	6
Tratamiento 11	Homogeneizado con 30 días de incubación	PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno	40

*El Tratamiento 2 se usó en la cepa de *Pleurotus ostreatus* (CP-754), por lo que ya no se considera en este cuadro.

8.3.3. Cinética de crecimiento

8.3.3.1. Inóculo homogeneizado

El inóculo homogeneizado se obtuvo de una caja de Petri de 60x15 mm con micelio crecido de la cepa CP-30, su contenido se colocó en un vaso de acero inoxidable y se

les adicionó 20 mL de agua estéril, se selló el vaso de acero inoxidable con un rotor y se procedió a homogenizar las colonias en un homogeneizador Pro 250-ProScientific a 10 000 rpm por 30 segundos.

Para los testigos 2, 4 y los tratamientos 3, 5, 7, 9, 11 se tomaron 500 µL del homogeneizado y se colocaron en cada caja de Petri de 100x15 mm, con una varilla de vidrio estéril se distribuyó la suspensión homogéneamente, las cajas Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente.

Para inocular el tratamiento 10, se tomaron 500 µL del homogeneizado y se colocaron en el lado de la caja de Petri con medio PDA+AAS 100 µM 100 previamente adicionada con 0.4 g de antraceno, el homogeneizado se distribuyó con una varilla de vidrio estéril por toda la mitad de la caja de Petri. Las cajas Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente (Figura 26).

8.3.3.2. Inóculo convencional

El inóculo convencional se tomó de una caja de Petri de 60x15 mm con micelio homogeneizado crecido previamente durante 15 días. En la campana de flujo laminar, con un popote de plástico estéril se cortaron círculos de la colonia de aproximadamente 5 mm de diámetro y con una aguja de disección estéril se colocaron en un extremo de una caja de Petri de 100x15 mm en los testigos 1, 3 y en los tratamientos 1, 4, 6, 8 (Figura 26).

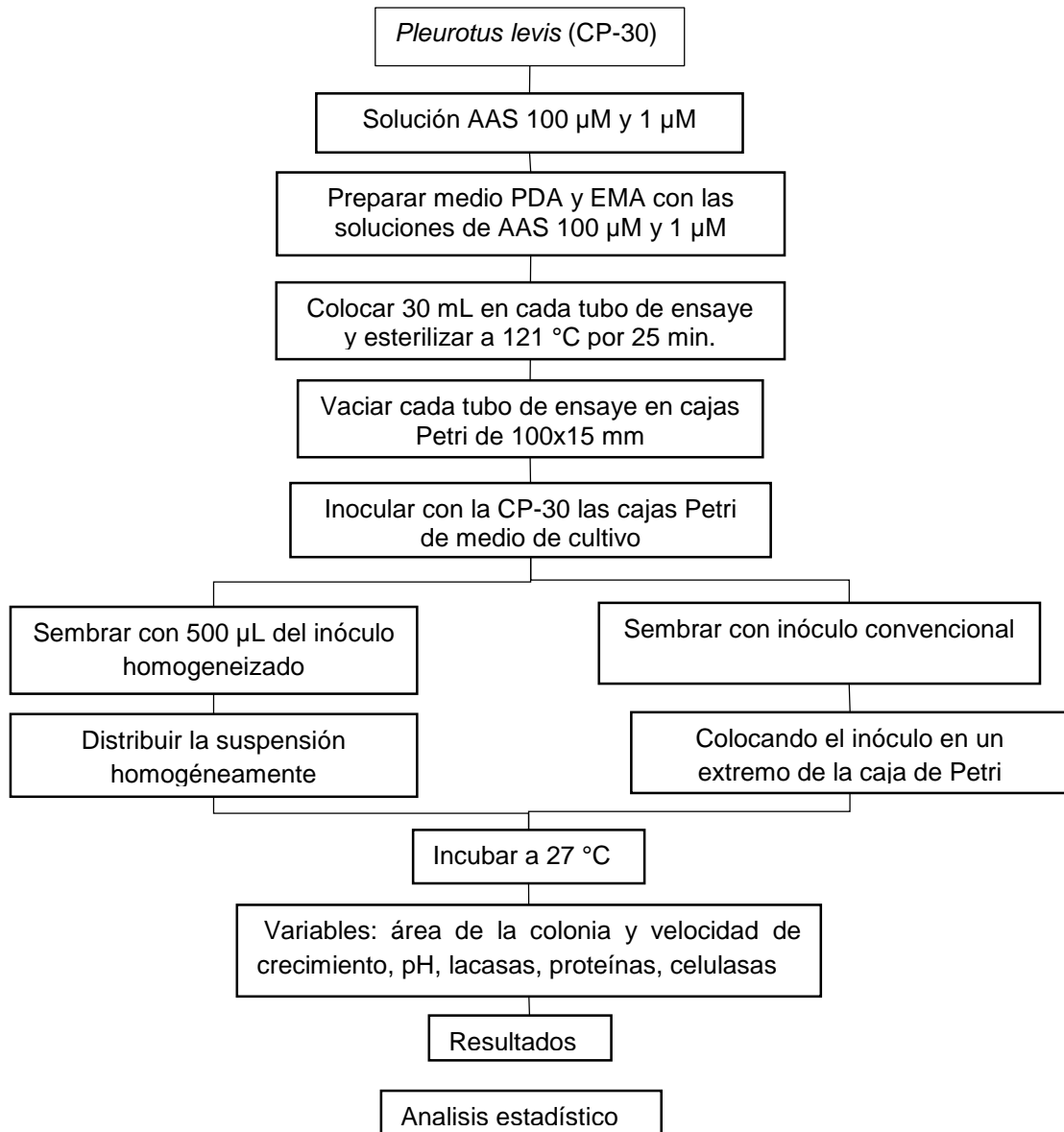


Figura 26. Inoculación de los medios EMA y PDA con inóculo convencional y homogeneizado de *Pleurotus levis* (CP-30).

8.3.4. Variables estudiadas

Las variables analizadas se definieron de acuerdo a la cinética, al tipo de inóculo, al volumen de la muestra y a la toma de muestra (Cuadro 12). Se pueden comparar por el tamaño de muestra (40 mL) el tratamiento 7 y el tratamiento 11. El tratamiento 7 se

repitió para comparar los resultados con los del tratamiento 10 por el volumen de 6 mL de la muestra debido al rectángulo de acero inoxidable.

Cuadro 12. Variables analizadas en cada muestra.

Muestra	Variable	Muestreo	Volumen de la muestra (mL)
Testigo 1	Área, velocidad de crecimiento lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 35 días	30
Testigo 2	Lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 15 días	30
Testigo 3	Área, velocidad de crecimiento, lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 35 días	30
Testigo 4	Lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 15 días	30
Tratamiento 1	Área, velocidad de crecimiento, lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 35 días	30
Tratamiento 3	Lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 15 días	30
Tratamiento 4	Área, velocidad de crecimiento, lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 35 días	30
Tratamiento 5	Lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 15 días	30
Tratamiento 6	Área, velocidad de crecimiento, lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 35 días	30
Tratamiento 7	Lacasas, proteínas, celulasas, MnP, pH	0, 15 días	30
		T0, AC, DC, CC	6
		30 + 7, 14, 21 días	40
Tratamiento 8	Área, velocidad de crecimiento, lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 35 días	40
Tratamiento 9	Lacasas, proteínas, celulasas, pH	0, 15 días	30
Tratamiento 10	Lacasas, MnP, pH	T0, AC, DC, CC	6
Tratamiento 11	Lacasas, MnP, pH	30 + 7, 14, 21 días	40

*T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la caja.

8.3.5. Fisiología y enzimas de *P. levis* (CP-30)

8.3.5.1. Testigo 1 (EMA con inóculo convencional)

Para medir la actividad enzimática de *P. levis* (CP-30) en el testigo 1 se utilizó medio de cultivo semisólido EMA con inóculo convencional. Se le preparó un blanco, el cual consistió en cajas con medio de cultivo EMA (sin inóculo), sirvió para verificar la esterilidad y la evolución del pH del medio de cultivo empleado a tiempo inicial la cinética. Se realizaron 3 repeticiones al testigo y al blanco para cada toma de muestra.

8.3.5.2. Testigo 2 (EMA con inóculo homogeneizado)

En el testigo 2 se utilizó el medio de cultivo semisólido EMA con inóculo homogeneizado. Al testigo también se le preparó un blanco, el cual consistió en cajas con medio de cultivo EMA (sin inóculo), y sirvió para verificar la esterilidad y la evolución del pH del medio de cultivo empleado a tiempo inicial de la cinética. Se realizaron 3 repeticiones al testigo y al blanco, para cada toma de muestra.

8.3.5.3. Testigo 3 (PDA con inóculo convencional)

En el testigo 3 se utilizó el medio de cultivo semisólido PDA con inóculo convencional. Se le preparó su blanco, con 3 repeticiones para el testigo y para el blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.4. Testigo 4 (PDA con inóculo homogeneizado)

En el testigo 4 se utilizó el medio de cultivo semisólido PDA con inóculo homogeneizado. Igualmente se le preparó un blanco con 3 repeticiones para el testigo y para el blanco, en cada toma de muestra.

8.3.5.5. Tratamiento 1 (EMA+AAS 1 μ M con inóculo convencional)

En el tratamiento 1 se utilizó el medio de cultivo semisólido EMA+AAS 1 μ M con inóculo convencional. Igualmente se le preparó un blanco, el cual consistió en cajas con medio de cultivo EMA+AAS 1 μ M y sin inóculo (blanco 3), y sirvió para verificar la esterilidad y la evolución del pH del medio de cultivo empleado a tiempo inicial de la cinética. Se realizaron 3 repeticiones tanto al tratamiento 1 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.6. Tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado)

En el tratamiento 3 se utilizó el medio de cultivo semisólido EMA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado. Al tratamiento 3 se le preparó su blanco, el cual consistió en cajas con medio de cultivo EMA+AAS 100 μ M (sin inóculo) para el mismo fin. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 3 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.7. Tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M con inóculo convencional)

En el tratamiento 4 se utilizó el medio de cultivo semisólido EMA+AAS 1 μ M con inóculo convencional. El tratamiento 4 tuvo su blanco para el mismo propósito. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 4 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.8. Tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μ M con inóculo homogeneizado)

En esta condición se utilizó el medio de cultivo semisólido EMA+AAS 1 μ M con inóculo homogeneizado. Contra un blanco. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 5 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.9. Tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M con inóculo convencional)

Para este tratamiento se utilizó el medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M con inóculo convencional. De referencia se preparó un blanco. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 6 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.10. Tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado)

En el tratamiento 7 se utilizó el medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M con inóculo homogeneizado. De igual manera se le preparó un blanco. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 7 y al blanco en cada toma de muestra (Figura 27).

8.3.5.11. Tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M con inóculo convencional)

Con el número 8 se identificó al tratamiento elaborado con medio de cultivo semisólido PDA+AAS 1 μ M sembrado con inóculo convencional. Al tratamiento 8 se le preparó un blanco. Se prepararon 3 repeticiones al tratamiento 8 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.12. Tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μ M con inóculo homogeneizado)

Se definió el tratamiento 9 utilizando el medio de cultivo semisólido PDA+AAS 1 μ M con inóculo homogeneizado. De igual forma se le preparó un blanco. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 9 y al blanco en cada toma de muestra.

8.3.5.13. Toma de muestras durante las cinéticas

Se realizó una cinética de dos tiempos, el inicial y el final. Para los tratamientos que fueron inoculados con inóculo convencional la cinética consistió en tomar muestras de tres cajas Petri al blanco, testigos y tratamientos en el tiempo 0 y después de 35 días de incubación. Para los tratamientos que fueron inoculados con inóculo homogeneizado la cinética consistió en tomar muestras de tres cajas Petri al blanco, testigos y tratamientos en el tiempo 0 y después de 15 días de incubación.

8.3.5.14. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras

Dentro de la campana de flujo laminar se colocó todo el contenido de la caja de Petri en un vaso de acero inoxidable de 250 mL estéril y se le agregaron 10 mL de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5, el procedimiento se realizó a cada repetición de los tratamientos, testigos y blancos. El contenido de la caja de Petri se homogeneizó en un homogeneizador Pro 250-Pro Scientific con un rotor estéril de 20 mm x 150 mm a 10 000 rpm hasta su completa homogenización. El homogeneizado se colocó en un tubo para centrifuga de 50 mL estéril (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) y se centrifugó a 10 000 rpm a 4° C durante 10 minutos en una centrifuga Sigma 4K15 Laboratory centrifuges. El sobrenadante se recuperó con una pipeta con puntas estériles y se colocó en tubos eppendorf estériles de 2 mL. Las muestras se colocaron en congelación a -2 °C hasta su uso.

8.3.5.15. Tratamiento 10 (PDA+AAS 100 µM con inóculo homogeneizado+0.4 g de antraceno)

Este tratamiento se preparó utilizando medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 µM sembrado con inóculo homogeneizado en presencia de 0.4 g de antraceno. Al tratamiento 10 se le preparó un blanco (sin inóculo). Se consideraron 3 repeticiones al tratamiento 10 y al blanco en cada toma de muestra (Figura 27).

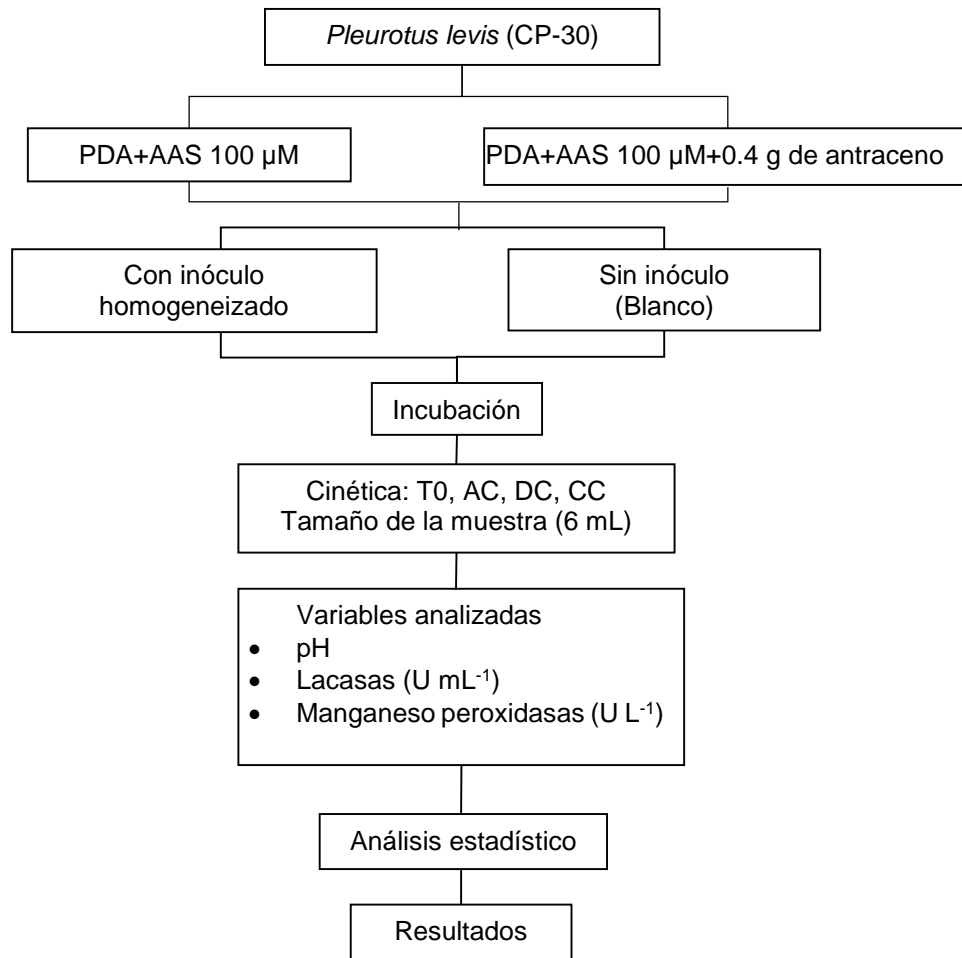


Figura 27. Descripción de los tratamientos 7 y 10 propuestos para determinar la actividad enzimática de *Pleurotus levis* (CP-30) en cultivo semisólido PDA en presencia de AAS 100 μM y 0.4 g de antraceno, utilizando inóculo homogeneizado.

Se pesaron 0.4 g de antraceno y se empaquetaron en un sobre de papel. Los sobres con antraceno se esterilizaron a 121°C por 25 min. Una vez esterilizado el antraceno se dejó enfriar hasta su uso. En campana de flujo laminar se cubrió con papel celofán estéril la mitad de la caja de Petri con medio de cultivo PDA+AAS 100 μM. El procedimiento de colocación de antraceno se describió en el apartado de *P. ostreatus* (CP-754). Una vez colocado el antraceno las cajas de Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente para su observación y muestro.

8.3.5.16. Toma de muestra en base al crecimiento de *P. levis* en presencia de antraceno

La toma de muestra se basó en la propuesta de Camacho-Martínez (2013). Este muestreo se basó en los momentos en que la colonia iba avanzando hacia el antraceno. Se inició el muestreo con el tiempo 0, que fue el día de la inoculación, el tiempo antes del contacto o de tocar el antraceno (AC), el tiempo después del contacto (DC) llevando 1 cm de colonizado el antraceno y, el tiempo de colonización completa de la caja de Petri (CC). Cuando el micelio creció sobre el antraceno y colonizó toda la caja (CC), la toma de muestra se realizó en dos partes de la caja. Una del lado de la colonia en donde se colocó el inóculo en el tiempo 0, indicada como CC- y, la otra muestra del lado de la colonia que cubrió el antraceno, indicada como CC+.

8.3.5.17. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras

A cada momento del crecimiento de la colonia se tomaron alícuotas de 6 mL de cada réplica (n=3). La manera en que se tomaron las alícuotas consistió en cortar con un rectángulo de acero inoxidable estéril una parte del agar, según el crecimiento del hongo. Dentro de la campana de flujo laminar se colocó la muestra del agar (6 mL) en un vaso de acero inoxidable de 250 mL estéril y se le agregaron 3 mL de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5, el procedimiento se realizó para las 3 repeticiones de los tratamientos, testigos y blancos. La muestra se homogenizó en un homogeneizador Pro 250-Pro Scientific con un rotor de 20 mm x 150 mm estéril a 10 000 rpm hasta su completa homogenización. El homogeneizado se transvasó a un tubo para centrifuga de 50 mL estéril (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) y se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrifuga Sigma 4K15 Laboratory centrifuges. El sobrenadante se recuperó con una pipeta automática con puntas estériles y se colocó en tubos eppendorf estériles de 2 mL. Las muestras se almacenaron en congelación a -2 °C hasta su uso.

8.3.5.18. Tratamiento 11 (PDA+AAS 100 μM con inóculo homogeneizado+0.4 g de antraceno colocado sobre la colonia)

En este tratamiento se utilizó el medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μM con inóculo homogeneizado desarrollado previamente por 30 días al cual se le esparcieron 0.4 g de antraceno sobre la colonia. Se realizaron 3 repeticiones al tratamiento 11 y al blanco en cada toma de muestra (Figura 28). Los 0.4 g de antraceno estéril se adicionaron sobre el micelio desarrollado a los 30 días de incubación en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μM . El antraceno se distribuyó de tal manera que cubriera todo el micelio. Una vez colocado el antraceno las cajas de Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente para su observación y muestreo.

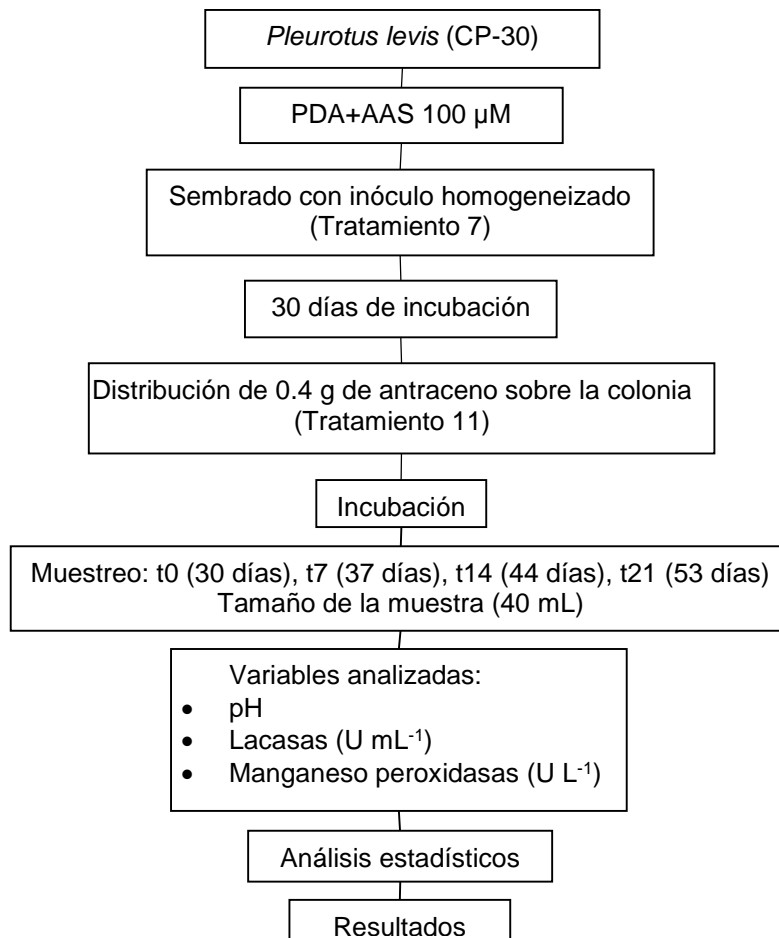


Figura 28. Diagrama de flujo del tratamiento 7 y 11 para determinar la actividad enzimática de *Pleurotus levis* (CP-30) en cultivo semisólido PDA en presencia de AAS 100 μM y 0.4 g de antraceno, utilizando inóculo homogeneizado a los 30 días de incubación.

8.3.5.19. Toma de muestra dependiendo del crecimiento de la colonia en el tratamiento 11

Las muestras se tomaron de 3 repeticiones del tratamiento con inóculo homogeneizado en medio PDA con 100 µM AAS a 30 días de crecimiento del inóculo. Después de haber distribuido el antraceno sobre la colonia se incubó 21 días más, tomando muestras a los 7, 14 y 21 días después de haber colocado el antraceno sobre el micelio.

8.3.5.20. Obtención y conservación del sobrenadante de las muestras para el tratamiento 11

Dentro de la campana de flujo laminar se colocó todo el contenido de la caja de Petri en un vaso de acero inoxidable de 250 mL estéril y se le agregaron 10 mL de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5, el procedimiento se realizó a las 3 repeticiones del tratamiento, testigo y blanco. El contenido de la caja de Petri se homogenizó en un homogeneizador Pro 250-Pro Scientific bajo las mismas condiciones. De igual forma el sobrenadante se recuperó con una pipeta con puntas estériles y se colocó en tubos eppendorf estériles de 2 mL. Las muestras se colocaron en congelación a -2 °C hasta su uso.

8.4. Resultados

8.4.1. Caracterización micelial y enzimática de *P. levis* (CP-30) en los medios de cultivo EMA y PDA adicionado con AAS 1 μ M y 100 μ M usando inóculo convencional y homogeneizado

En la figura 29 se observan los testigos y tratamientos en medio de cultivo EMA y PDA adicionado con AAS usando inóculo convencional después de 35 días de incubación. En los tratamientos con medio de cultivo PDA, se observó en el testigo 3 (PDA sin AAS), en el tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M) y en el tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M), el inóculo convencional tuvo un crecimiento lento, pero mayor que en medio de cultivo EMA, se observó la formación de una pequeña colonia de color crema en el centro y blanca en el margen de la colonia, con una textura aterciopelada. Se observó menor crecimiento de la colonia en el tratamiento 6 y mayor crecimiento en el tratamiento 8, lo que indicó que la adición del AAS en una concentración pequeña, incrementa el tamaño de la colonia y una concentración mayor impide un mayor crecimiento. En el testigo 1 (EMA sin AAS), en el tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M) y en el tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μ M), el inóculo convencional tuvo un crecimiento lento, formando una pequeña colonia de color crema en el centro y blanca en el margen de la colonia, con una textura aterciopelada. Aun así se observó menor crecimiento de la colonia en el tratamiento 1 y mayor crecimiento en el testigo 1, lo que indicó que a mayor concentración de AAS es menor el crecimiento de la colonia, por lo que la adición de AAS no representó un incremento en el crecimiento de la colonia usando inóculo convencional.

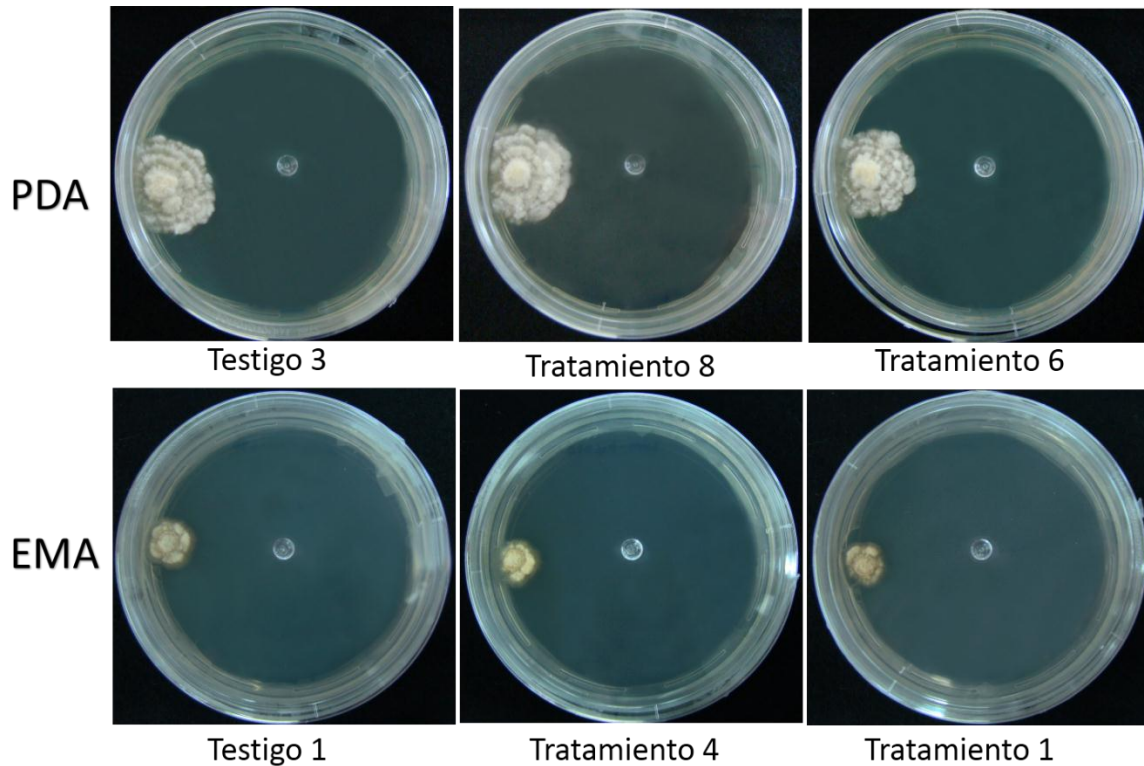


Figura 29. Crecimiento de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1). usando inóculo convencional después de 35 días de incubación.

En la figura 30 se observan los testigos y tratamientos en medio de cultivo EMA y PDA adicionado con AAS usando inóculo homogeneizado después de 15 días de incubación. En los tratamientos en medio PDA el testigo 4 (PDA sin AAS) presentó una colonia blanca con textura algodonosa, la cual colonizó por completo la caja de Petri en un lapso de 15 días, el tratamiento 9 (PDA sin AAS+AAS 1 μ M) presentó una colonia blanca con textura algodonosa que logro colonizar por completo toda la caja al igual que el tratamiento 7 (PDA sin AAS+ AAS100 μ M), a simple vista no se nota algún efecto del AAS sobre el crecimiento de la colonia. En medio de cultivo EMA el testigo 2 (EMA sin AAS) presentó una colonia blanca con pequeños brotes sin llegar a colonizar por completo toda la caja, el mismo comportamiento se observó en los tratamiento 5 (PDA sin AAS+AAS 1 μ M) y 3 (PDA sin AAS+AAS 1 μ M) donde a los 15 días la colonia no logro colonizar por completo la caja de Petri.

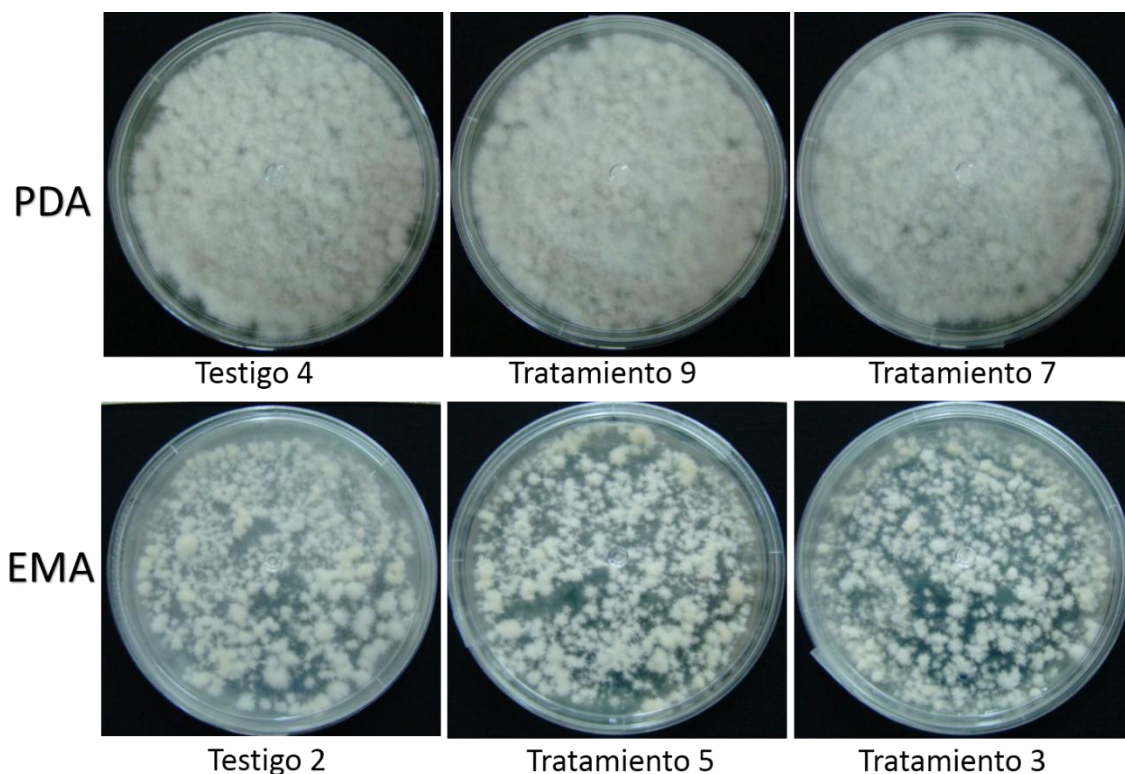


Figura 30. Crecimiento de *Pleurotus levis* (CP-30) en medios de cultivo PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5) y EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) usando inóculo homogeneizado después de 15 días de incubación.

8.4.1.1. Área de la colonia y velocidad de crecimiento

En la figura 31 se muestra la cinética del área de crecimiento de *P. levis* (CP-30) del testigo 1 (EMA sin AAS), testigo 3 (PDA sin AAS), tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M), tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μ M), tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M) y tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M). El área de crecimiento en medio de cultivo semisólido EMA es aproximadamente un 60 % menor que en PDA, a los 35 días de incubación el testigo 1 presento un área de 2.133 cm², el tratamiento 4 de 2.012 cm² y el tratamiento 1 de 2.04 cm². Se observa una mayor área de crecimiento en los tratamientos en medio PDA, al final de la cinética a los 35 días de incubación el tratamiento 8 presento un área de 8.106 cm², el testigo 3 de 7.219 cm² y el tratamiento 6 de 6.544 cm², en donde el tratamiento 8 con AAS 1 μ M presento el mayor crecimiento. Por lo que es mayor el crecimiento de *P. levis* (CP-30) en medio de cultivo PDA con la adición de AAS 1 μ M y en medio EMA la adición de AAS no incrementa el crecimiento de la colonia.

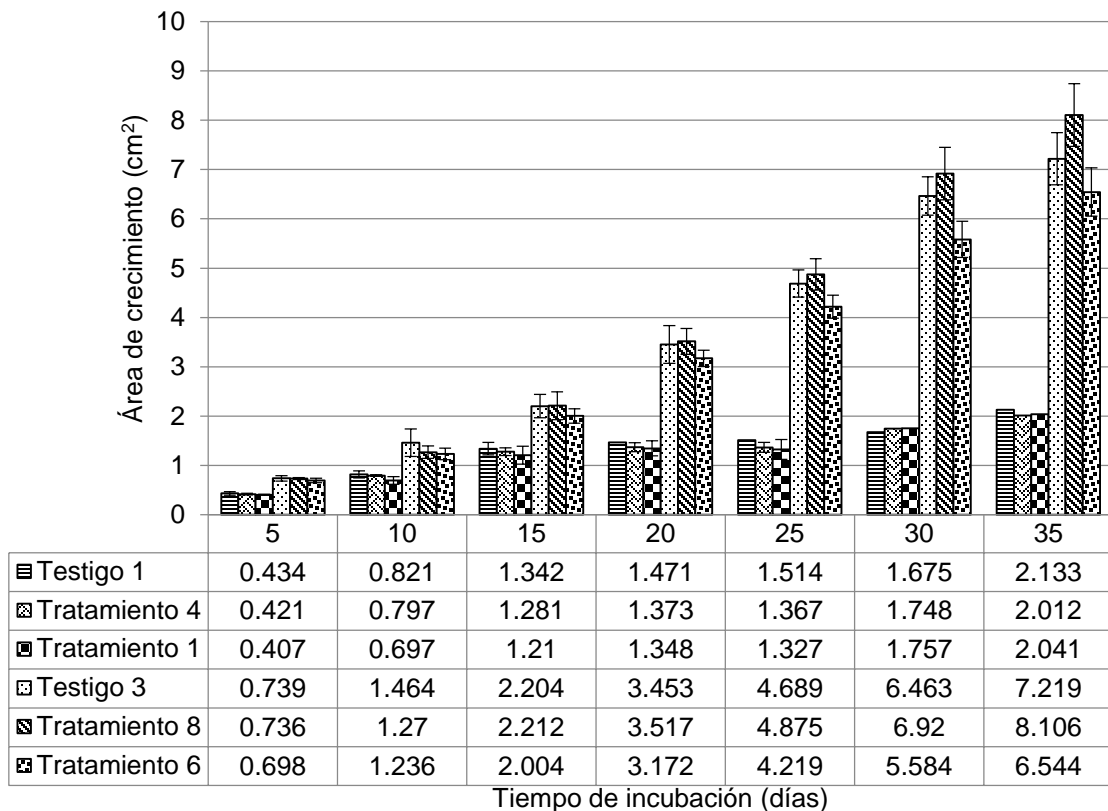


Figura 31. Área de crecimiento de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1), PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6) a los 35 días de incubación (n=3).

En la figura 32 se muestra la velocidad de crecimiento de *P. levis* (CP-30) del testigo 1 (EMA sin AAS), testigo 3 (PDA sin AAS), tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M), tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μ M), tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M) y tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M). La velocidad de crecimiento en medio de cultivo semisólido EMA fue aproximadamente un 60% menor que en PDA, a los 35 días de incubación el testigo 1 presentó una velocidad de 0.623 cm, el tratamiento 4 de 0.547 cm y el tratamiento 1 una velocidad de 0.534 cm, no se presentó una diferencia significativa entre el testigo y los tratamientos. Por lo que la presencia del AAS no representó ningún efecto en la velocidad de crecimiento de *P. levis* (CP-30). Se observó una mayor velocidad de crecimiento en cultivo semisólido PDA presentando al final de la cinética la velocidad de crecimiento fue de 1.394 cm en el testigo 3, 1.537 cm en el tratamiento 8 y de 1.228

cm en el tratamiento 6, observando que el tratamiento con AAS 1 μM presentó mayor velocidad de crecimiento, lo cual es correspondiente con el área de crecimiento.

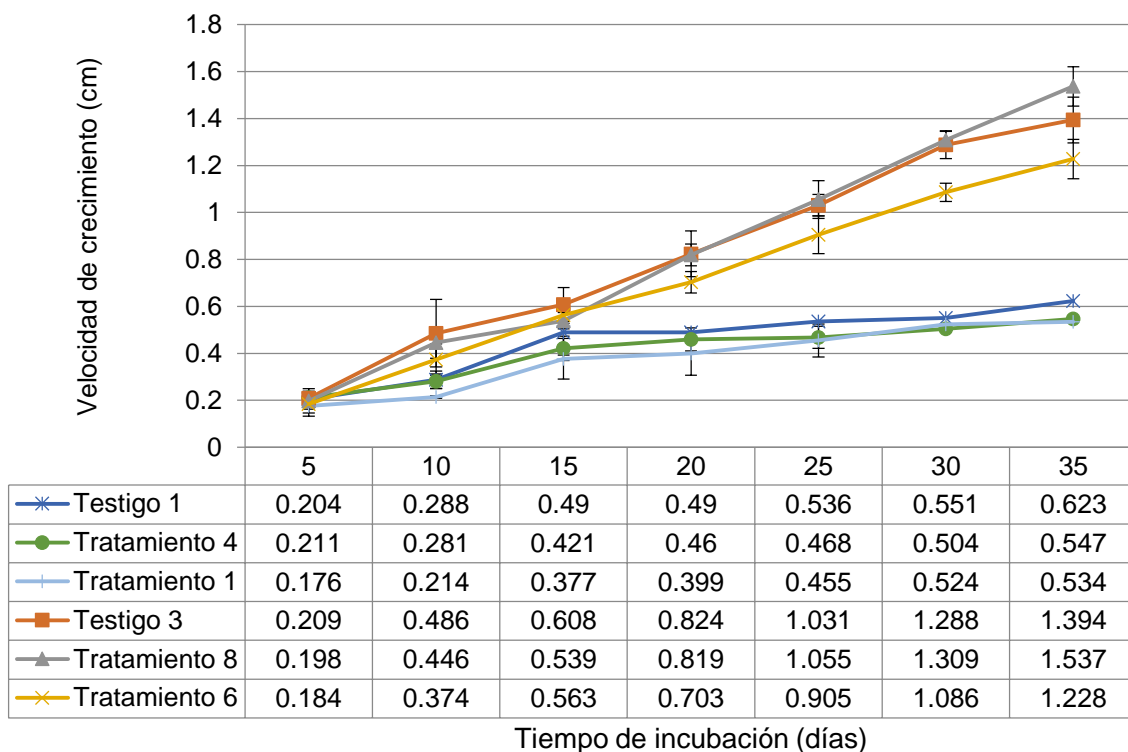


Figura 32. Velocidad de crecimiento de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μM (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1), PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μM (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 6) (n=3).

8.4.1.2. pH

En el cuadro 13 se observó que el pH del medio de cultivo semisólido PDA usando inóculo convencional fue mayor con respecto al pH del medio de cultivo semisólido EMA usando inóculo convencional. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.001$ y $R^2 = 0.99$. El pH en medio de cultivo semisólido PDA usando inóculo convencional presentó una disminución con respecto al tiempo inicial del tiempo final el cual corresponde a los 35 días de incubación (Anexo 8).

Cuadro 13. pH de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA y EMA en presencia de AAS 1 μ M y 100 μ M usando inóculo homogeneizado y convencional.

Tiempo de incubación (Inoculación)	Medio de cultivo	Muestras	pH	
0 días	PDA	Testigo 3 y 4	6.25 \pm 0.076	a*
	PDA+ AAS 1 μ M	Tratamientos 8 y 9	6.23 \pm 0.040	a
	PDA+ AAS 100 μ M	Tratamientos 7 y 6	6.24 \pm 0.035	a
	EMA	Testigo 1 y 2	6.15 \pm 0.036	ab
	EMA+ AAS 1 μ M	Tratamientos 4 y 5	6.22 \pm 0.023	a
	EMA+ AAS 100 μ M	Tratamientos 1 y 3	6.16 \pm 0.024	ab
15 días (Inóculo homogeneizado)	PDA	Testigo 4	5.77 \pm 0.042	d
	PDA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 9	5.78 \pm 0.026	d
	PDA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 7	5.79 \pm 0.025	d
	EMA	Testigo 2	4.83 \pm 0.028	f
	EMA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 5	4.79 \pm 0.030	f
	EMA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 3	4.69 \pm 0.034	f
35 días (Inóculo convencional)	PDA	Testigo 3	5.99 \pm 0.038	bc
	PDA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 8	5.83 \pm 0.006	cd
	PDA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 6	5.98 \pm 0.029	c
	EMA	Testigo 1	5.20 \pm 0.007	e
	EMA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 4	5.16 \pm 0.009	e
	EMA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 1	5.12 \pm 0.021	e

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la figura 33 se observan los valores del pH usando inóculo homogeneizado en el testigo 4 (PDA), tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μ M), tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M), testigo 2 (EMA), tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μ M) y tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μ M). El pH en medio de cultivo semisólido PDA usando inóculo homogeneizado disminuyó después de 15 días de incubación. En el testigo 4 el pH inicial fue de 6.25 y a los 15 días de incubación fue de 6.15, en el tratamiento 9 el pH inicial fue de 6.23 y el final de 6.22 representando un ligero decremento, en el tratamiento 7 el pH inicial fue de 6.24 y el final de 6.16. En medio de cultivo EMA usando inóculo homogeneizado el pH aumentó después de 15 días de incubación. El pH inicial del testigo 2 fue de 4.83 y final de 5.99, en el tratamiento 5 el pH inicial fue de 4.79 y el final de 5.83 y en el tratamiento 3 el pH inicial fue de 4.69 y el final de 5.98. Por lo que en medio PDA usando inóculo homogeneizado *P. levis* (CP-30) acidificó ligeramente el medio y en el medio EMA lo volvió más básico.

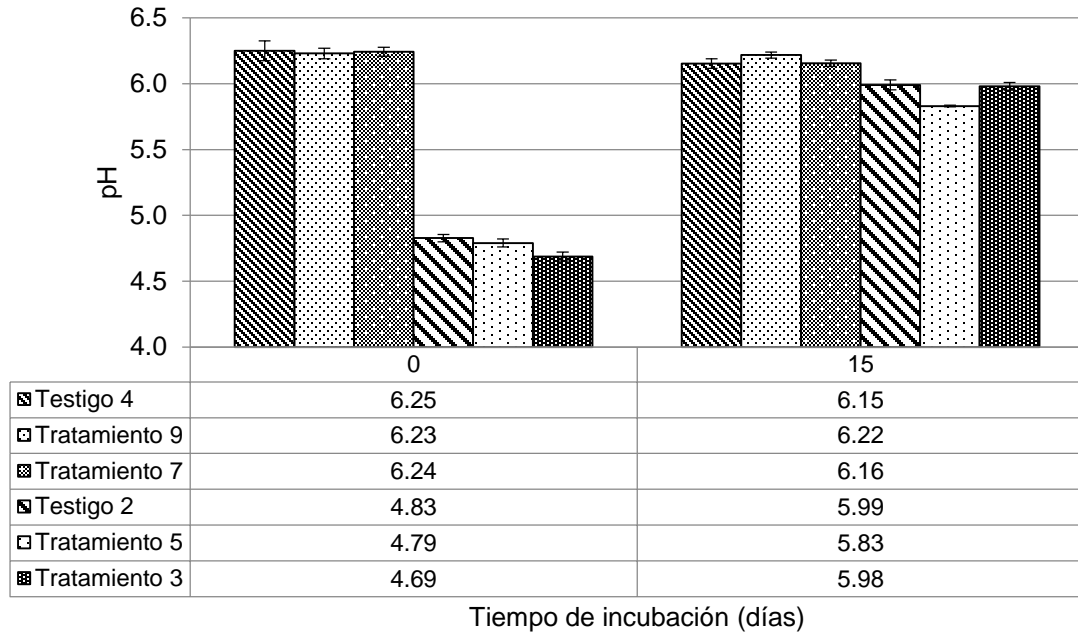


Figura 33. pH de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).

En la figura 34 se observan los resultados del pH usando inóculo convencional en el testigo 3 (PDA), tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M), tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M), testigo 1 (EMA), tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M) y tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μ M). El pH en medio de cultivo semisólido PDA usando inóculo homogeneizado, disminuyó después de 15 días de incubación. En el testigo 3 el pH inicial fue de 6.25 y a los 15 días de incubación fue de 5.77, en el tratamiento 8 el pH inicial fue de 6.23 y el final de 5.78, en el tratamiento 6 el pH inicial fue de 6.24 y el final de 5.79. En medio de cultivo EMA usando inóculo convencional el pH aumentó después de 15 días de incubación. El pH inicial del testigo 1 fue de 4.83 y final de 5.2, en el tratamiento 4 el pH inicial fue de 4.79 y el final de 5.16 y en el tratamiento 1 el pH inicial fue de 4.69 y el final de 5.12. Por lo que en medio PDA usando inóculo convencional de *P. levis* (CP-30) acidificó ligeramente el medio y en medio EMA lo volvió más básico al igual que en los tratamientos usando inóculo homogeneizado.

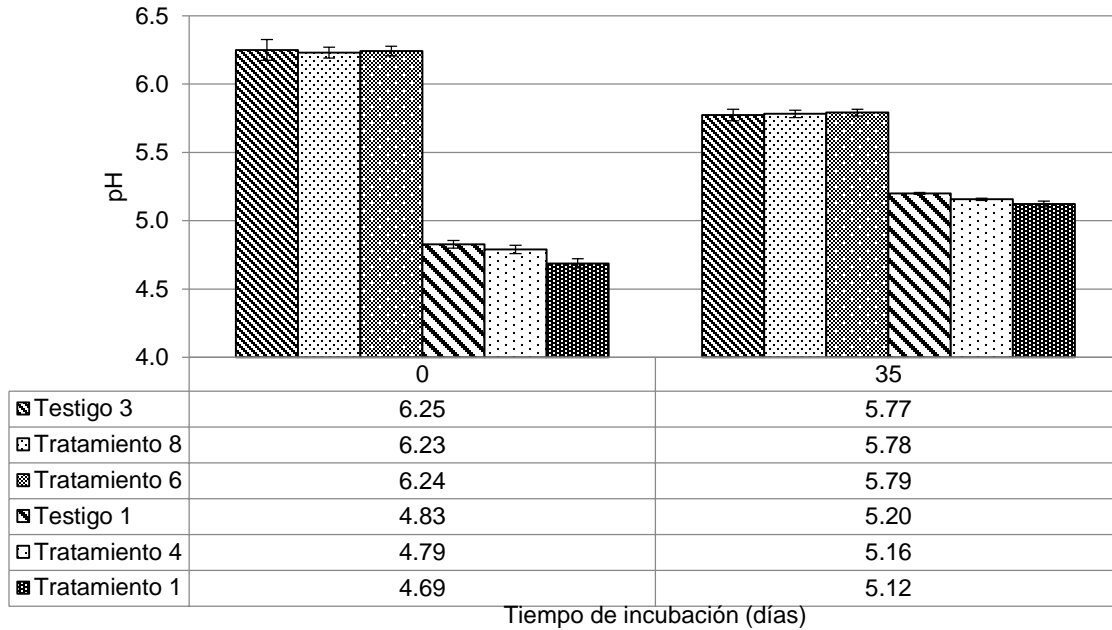


Figura 34. pH de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μM (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μM (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) (n=3).

8.4.1.3. Contenido de proteínas

En la figura 35 se muestra el contenido de proteínas usando inóculo homogeneizado en el testigo 4 (PDA), tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μM), tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μM), testigo 2 (EMA), tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μM) y tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μM). El contenido de proteínas en medio de cultivo semisólido PDA usando inóculo homogeneizado se mantuvo constante después de 15 días de incubación. En el testigo 4 el contenido inicial fue de 16.823 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y a los 15 días de incubación fue de 14.329 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en el tratamiento 9 el contenido inicial fue de 13.698 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el final de 15.727 $\mu\text{g mL}^{-1}$ representando un ligero aumento, en el tratamiento 7 el contenido inicial fue de 14.85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el final de 14.439 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En medio de cultivo EMA usando inóculo homogeneizado el contenido de proteínas aumento considerablemente después de 15 días de incubación. En el tiempo 0 no se presentó diferencia significativa entre el testigo 2 (8.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los tratamientos 5 (11.889 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y 3 (12.026 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se presentó una diferencia significativa entre el tiempo 0 y a los 15 días, en el testigo 2 se observó un aumento del 214% del contenido de

proteínas, en el tratamiento 5 se observó un aumento de 176% y en el tratamiento 3 un aumento de 638%. También se observó que después de 15 días de incubación el tratamiento 3 presentó un mayor contenido de proteínas, lo que indica que la adición de AAS 100 μM en medio EMA aumenta un 229% el contenido de proteínas se obtuvo con respecto al testigo 2. Es mayor el contenido de proteínas en medio de cultivo EMA que en PDA, después de 15 días de incubación.

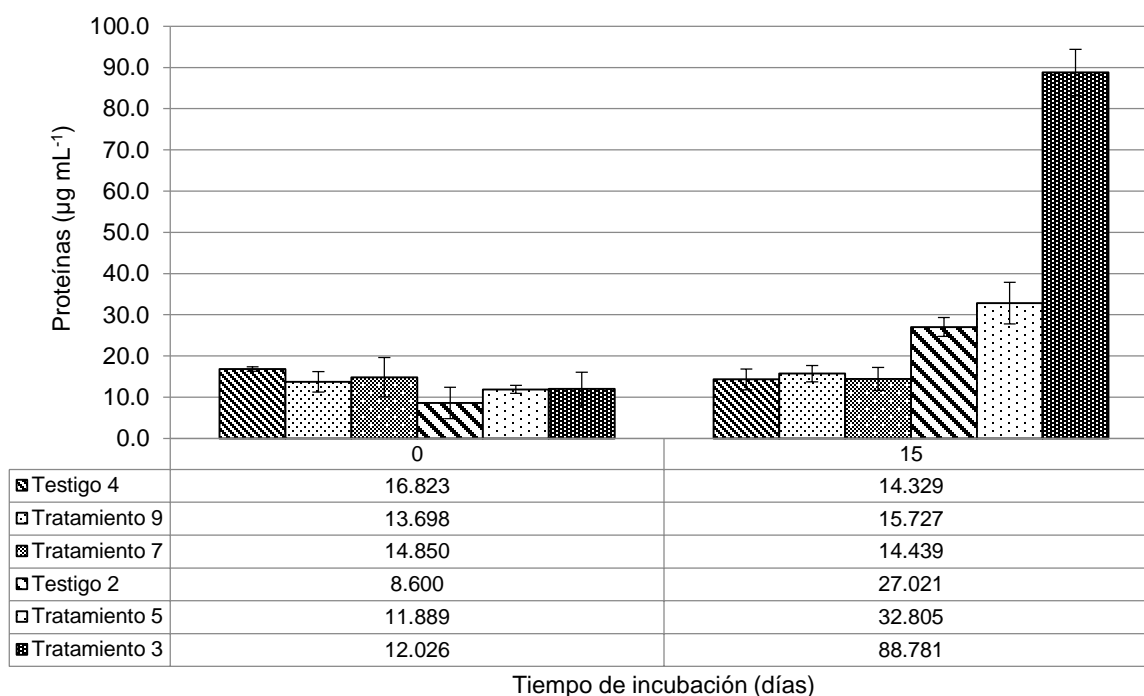


Figura 35. Contenido de proteínas de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μM (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μM (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 3) (n=3).

En la figura 36 se muestra el contenido de proteínas de *P. levis* (CP-30) usando inóculo convencional en el testigo 3 (PDA), tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μM), tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μM), testigo 1 (EMA), tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μM) y tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μM). En medio de cultivo PDA en 0 días de incubación el testigo 3 y los dos tratamientos presentaron mayor contenido de proteínas que a los 35 días de incubación. En medio de cultivo semisólido EMA se presenta un mayor contenido de proteínas a los 35 días de incubación, en donde el tratamiento 5 presentó el mayor

contenido de proteínas con valores de 21.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Siendo mayor la concentración de proteínas en medio de cultivo semisólido EMA con AAS 100 μM .

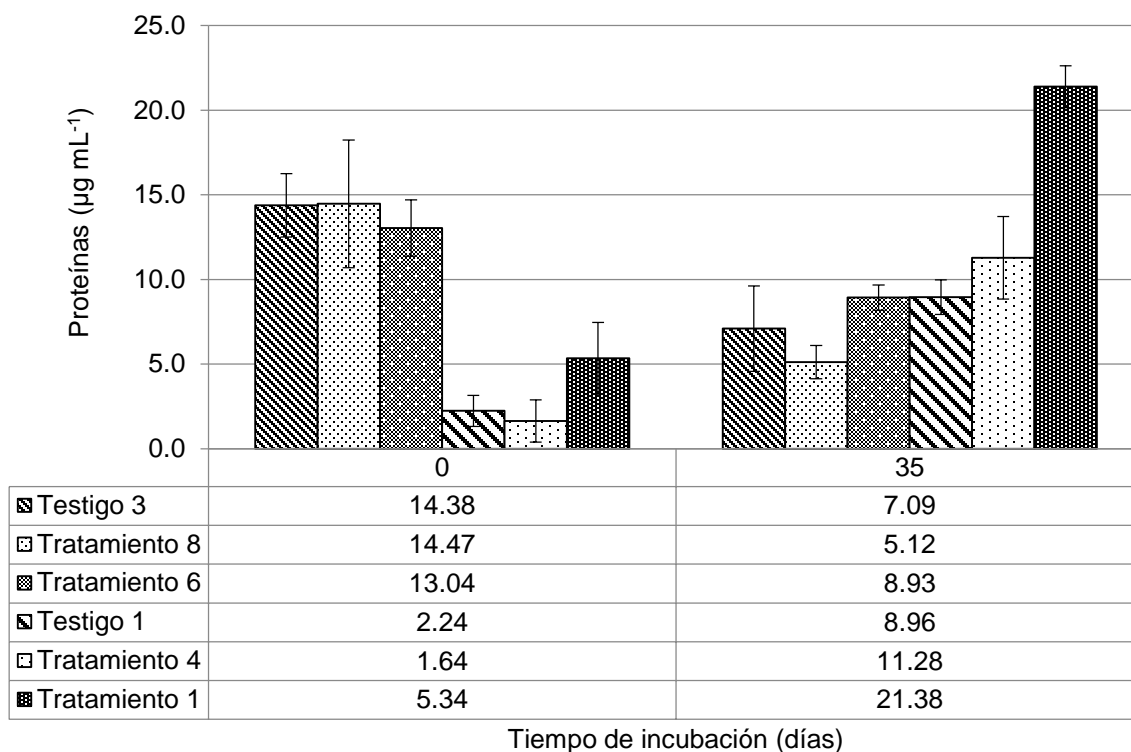


Figura 36. Contenido de proteínas de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μM (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μM (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) (n=3).

8.4.1.4. Actividad de lacasas

En el cuadro 14 se observa la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en el testigo 4 (PDA), tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μM), tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μM), testigo 2 (EMA), tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μM) y tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μM). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 0.98$. Los resultados mostraron que el tratamiento 3 tuvo significativamente ($P \leq 0.05$) mayor actividad enzimática de lacasas comparado con los demás testigos y tratamientos (Anexo 9).

Cuadro 14. Actividad de lacasas de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA y EMA en presencia de AAS 1 μ M y 100 μ M usando inóculo homogeneizado y convencional.

Tiempo de incubación (Inoculación)	Medio de cultivo	Muestras	Lacasas
0 días	PDA	Testigo 3 y 4	0.049 \pm 0.009 f
	PDA+ AAS 1 μ M	Tratamientos 8 y 9	0.115 \pm 0.018 f
	PDA+ AAS 100 μ M	Tratamientos 7 y 6	0.040 \pm 0.022 f
	EMA	Testigo 1 y 2	0.046 \pm 0.016 f
	EMA+ AAS 1 μ M	Tratamientos 4 y 5	0.155 \pm 0.065 f
	EMA+ AAS 100 μ M	Tratamientos 1 y 3	0.146 \pm 0.025 f
15 días (Inóculo homogeneizado)	PDA	Testigo 4	25.903 \pm 2.083 cd
	PDA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 9	23.213 \pm 1.236 cd
	PDA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 7	35.699 \pm 2.073 b
	EMA	Testigo 2	26.690 \pm 1.651 cd
	EMA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 5	28.756 \pm 0.797 bc
	EMA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 3	49.802 \pm 4.951 a
35 días (Inóculo convencional)	PDA	Testigo 3	9.539 \pm 0.148 e
	PDA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 8	10.893 \pm 1.539 e
	PDA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 6	19.618 \pm 1.316 d
	EMA	Testigo 1	5.022 \pm 0.370 ef
	EMA+ AAS 1 μ M	Tratamiento 4	5.037 \pm 0.529 ef
	EMA+ AAS 100 μ M	Tratamiento 1	4.196 \pm 1.040 ef

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la figura 37 se observa la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en el testigo 4 (PDA), tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μ M), tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M), testigo 2 (EMA), tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μ M) y tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μ M). En el tiempo 0 los testigos y los tratamientos no presentaron actividad enzimática, después de 15 días de incubación se presentó mayor actividad de lacasas en el tratamiento 3 con 49.802 U mL⁻¹ y en el tratamiento 7 con 35.699 U mL⁻¹. Se observó que los tratamientos con inóculo homogeneizado en medio de cultivo EMA fueron mayores en medio de cultivo PDA.

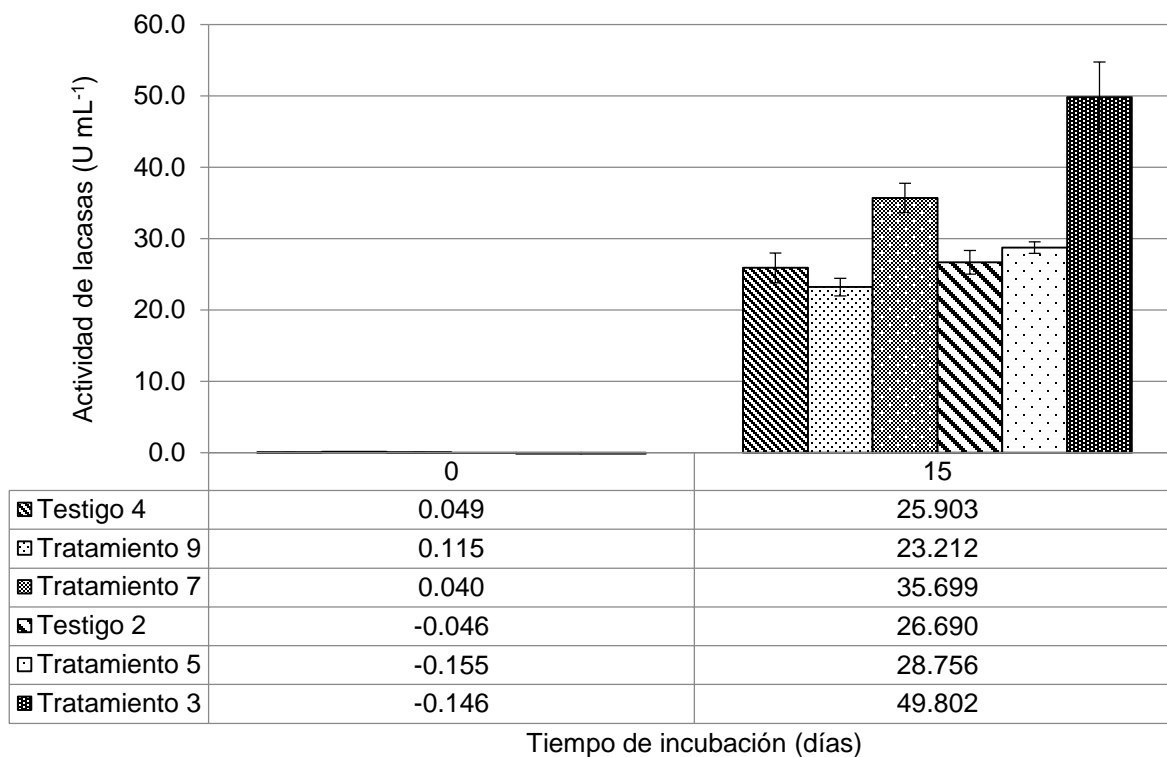


Figura 37. Actividad de lacasas *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).

En la figura 38 se muestra la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) usando inóculo convencional en el testigo 3 (PDA), tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M), tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M), testigo 1 (EMA), tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M) y tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μ M). En el tiempo 0 los testigos y tratamientos no presentaron actividad de lacasas, después de 35 días de incubación se presentó mayor actividad de lacasas en el tratamiento 6 con 19.618 U mL⁻¹ lo que representa un aumento del 106 % con respecto al testigo 3 (9.539 U mL⁻¹). Los tratamientos en medio de cultivo EMA presentaron una actividad menor, el testigo 1 y el tratamiento 4 presentaron una actividad de lacasas de 5.022 U mL⁻¹ y el tratamiento 1 de 4.196 U mL⁻¹. Se observó que los tratamientos con inóculo homogeneizado en medio de cultivo EMA fueron mayores que en medio de cultivo PDA, pero con inóculo convencional fueron mejores en PDA. Entre inóculo convencional y homogeneizado la mayor actividad de lacasas la presentaron los tratamientos sembrados con inóculo homogeneizado.

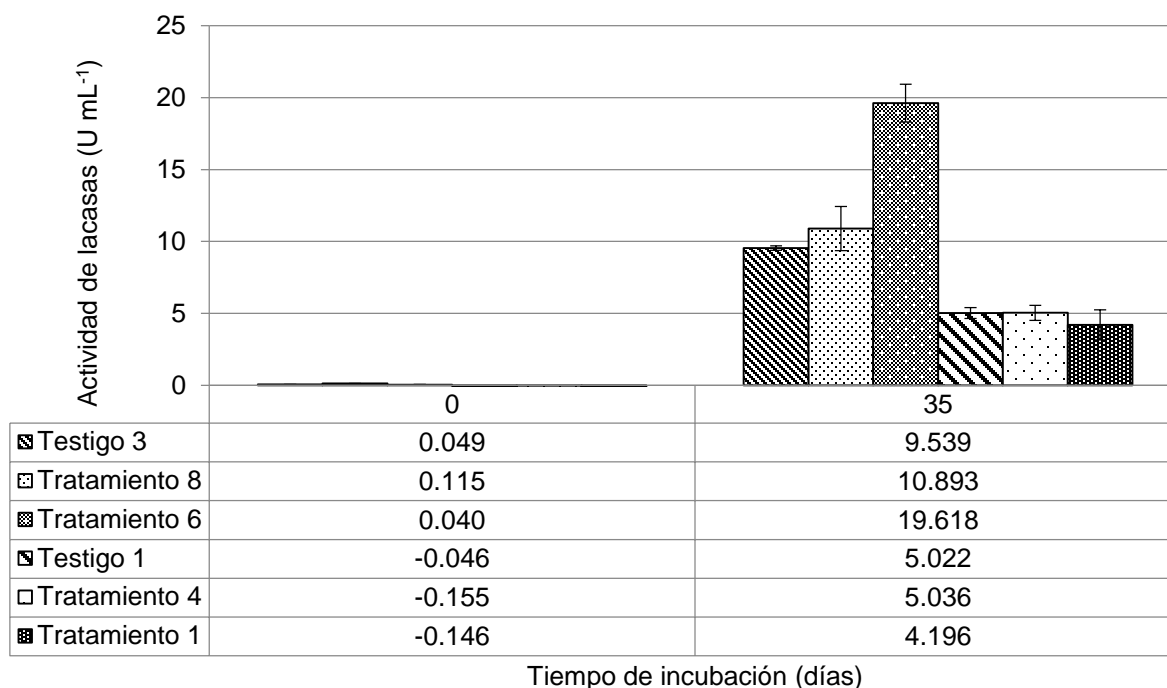


Figura 38. Actividad de lacasas *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μM (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μM (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μM (Tratamiento 1) (n=3).

8.4.1.5. Actividad de celulasas

En la figura 39 se muestra la actividad de celulasas de *P. levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en el testigo 4 (PDA), tratamiento 9 (PDA+AAS 1 μM), tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μM), testigo 2 (EMA), tratamiento 5 (EMA+AAS 1 μM) y tratamiento 3 (EMA+AAS 100 μM). La actividad de celulasas fue mayor a los 0 días que a 15 días de incubación, a los 0 días fue mayor la actividad en el testigo 4 (14.948 g L^{-1}) y los tratamientos 9 (18.357 g L^{-1}) y 7 (18.678 g L^{-1}). Después de 15 días de incubación en el testigo 4 la actividad disminuyó a 13.08 g L^{-1} , en el tratamiento 9 a 11.432 g L^{-1} y en el tratamiento 7 a 10.384 g L^{-1} . En medio de cultivo semisólido EMA no se observa diferencia significativa en la actividad a los 0 días, siendo de 7.077 g L^{-1} en el testigo 2 y en los tratamientos 5 de 7.359 g L^{-1} y 3 de 7.556 g L^{-1} , después de 15 días de incubación la actividad de celulasas fue 4.6 g L^{-1} en el testigo 2 y de 5 g L^{-1} en los tratamientos 5 y 3. Por lo que la actividad de lacasas fue mayor en medio de cultivo PDA.

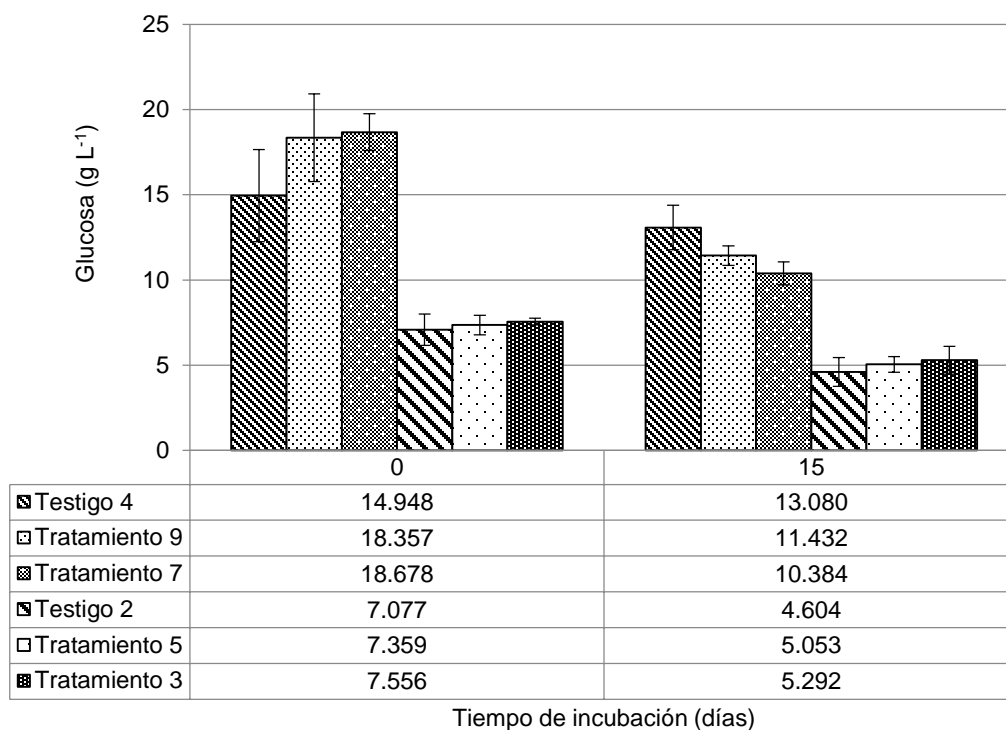


Figura 39. Actividad de celulasas de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 4), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 9), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7), EMA (Testigo 2), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 5), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 3) (n=3).

En la figura 40 se muestra la actividad de celulasas de *P. levis* (CP-30) usando inóculo convencional en el testigo 3 (PDA), tratamiento 8 (PDA+AAS 1 μ M), tratamiento 6 (PDA+AAS 100 μ M), testigo 1 (EMA), tratamiento 4 (EMA+AAS 1 μ M) y tratamiento 1 (EMA+AAS 100 μ M). En medio de cultivo PDA a los 0 días de incubación el testigo 3 (15.05 g L⁻¹) y los tratamientos 8 (18.377 g L⁻¹) y 6 (17.95 g L⁻¹) presentaron mayor actividad que el testigo 1 (7.453 g L⁻¹) y que los tratamientos 4 (7.183 g L⁻¹) y 5 (7.556 g L⁻¹). Después de 35 días de incubación se presentó mayor actividad en los tratamientos 8 (34.775 g L⁻¹) y 6 (21.979 g L⁻¹) y, en el testigo 3 (24.438 g L⁻¹), donde el tratamiento 8 presentó la mayor actividad de celulasas.

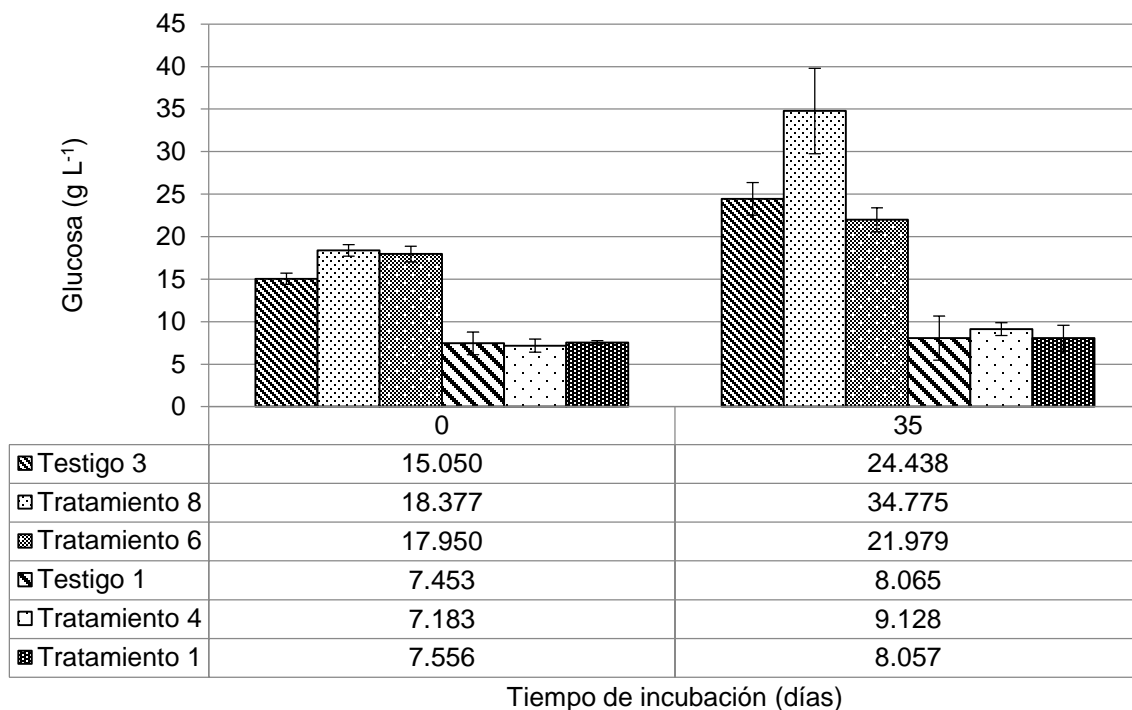


Figura 40. Actividad de celulasas de *Pleurotus levis* (CP-30) usando inóculo convencional en medio de cultivo semisólido PDA (Testigo 3), PDA+AAS 1 μ M (Tratamiento 8), PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 6), EMA (Testigo 1), EMA+AAS 1 μ M (Tratamiento 4), EMA+AAS 100 μ M (Tratamiento 1) (n=3).

8.4.2. Determinación del potencial enzimático de *P. levis* (CP-30) en presencia de AAS 100 μ M y de 0.4 g antraceno

En la figura 41 se observa el crecimiento del micelio en los diferentes tiempos de toma de muestra de *P. levis* (CP-30) en el tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M) y en el tratamiento 10 (PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno), también se observan los lugares en donde se tomó la muestra. El tratamiento 7 presentó un micelio más desarrollado. En el tiempo antes del contacto se observó una colonia joven que no ha colonizado toda la superficie de agar, en el tiempo DC se observó como el micelio hizo contacto con el antraceno y en el tiempo CC se observa como el micelio ha colonizado casi toda la superficie de la caja de Petri.

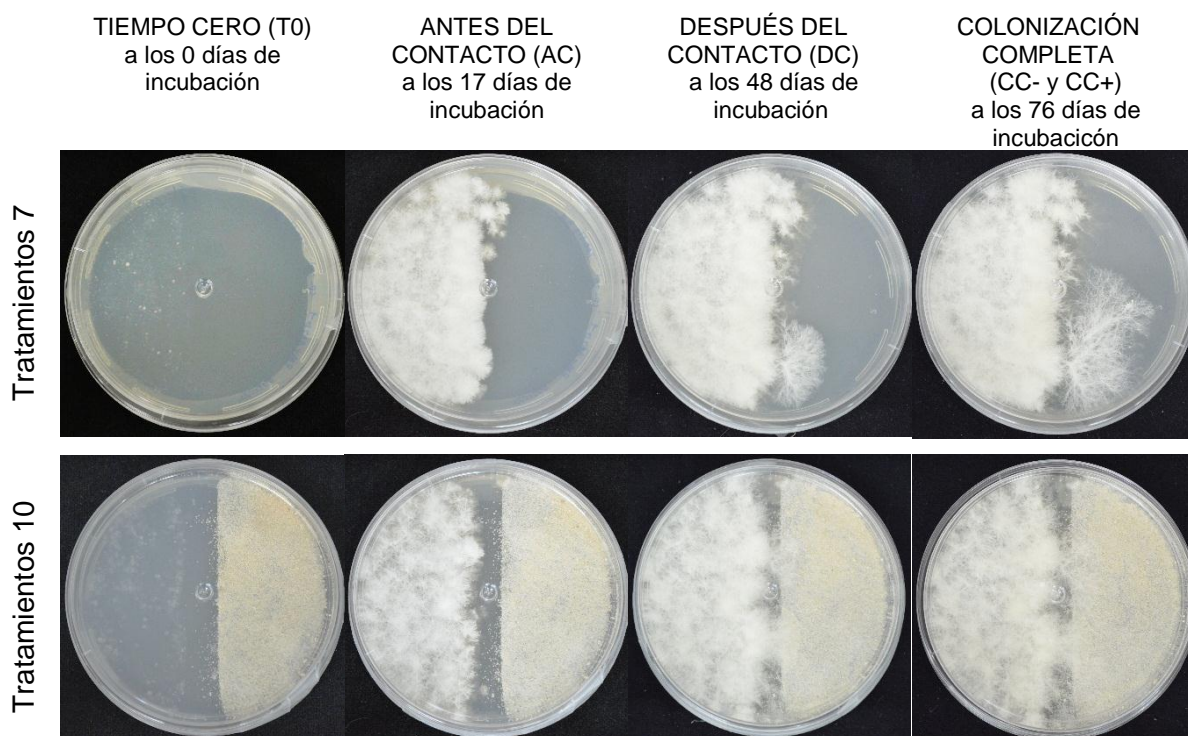


Figura 41. Crecimiento de la colonia de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno.

8.4.2.1. pH

En el cuadro 15 se observa el pH del tratamiento 7 (PDA+AAS 100 µM) y el tratamiento 10 (PDA+AAS 100 µM+0.4 g). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0007$ y $R^2 0.75$, no se presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre ambos tratamientos, tampoco hubo diferencia significativa a lo largo de los diferentes puntos en los que se tomaron las muestras (Anexo 10).

Cuadro 15. pH de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10).

Muestreo y tiempo incubación	Blanco	Tratamiento 7	Tratamiento 10
Tiempo 0	0	5.802±0.007 c*	5.901±0.003 abc
Tiempo AC (17 días)		5.982±0.035 a	5.909±0.034 abc
Tiempo DC (48 días)		5.972±0.008 ab	5.914±0.035 ab
Tiempo CC (76 días)	0	5.943±0.008 ab	5.870±0.005 bc

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En la figura 42 se observa el pH de *P. levis* (CP-30) en el tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M) y en el tratamiento 10 (PDA+AAS 100 μ M+0.4 g). En el tiempo 0 el pH del tratamiento 7 fue de 5.8 y del tratamiento 10 fue de 5.9, presentando una diferencia de 0.102; en el tiempo AC el pH del tratamiento 7 fue mayor que el del tratamiento 10 con una diferencia de 0.073, en el tiempo DC el pH del tratamiento 10 se mantuvo igual que el pH del tiempo AC siendo de 5.9 y el pH del tratamiento 10 fue menor que el tratamiento 7, presentando un diferencia de 0.06, en el tiempo de colonización completa de la colonia el pH del tratamiento 7 (pH 5.9) fue menor con respecto a los valores obtenidos en el tiempo AC y DC.

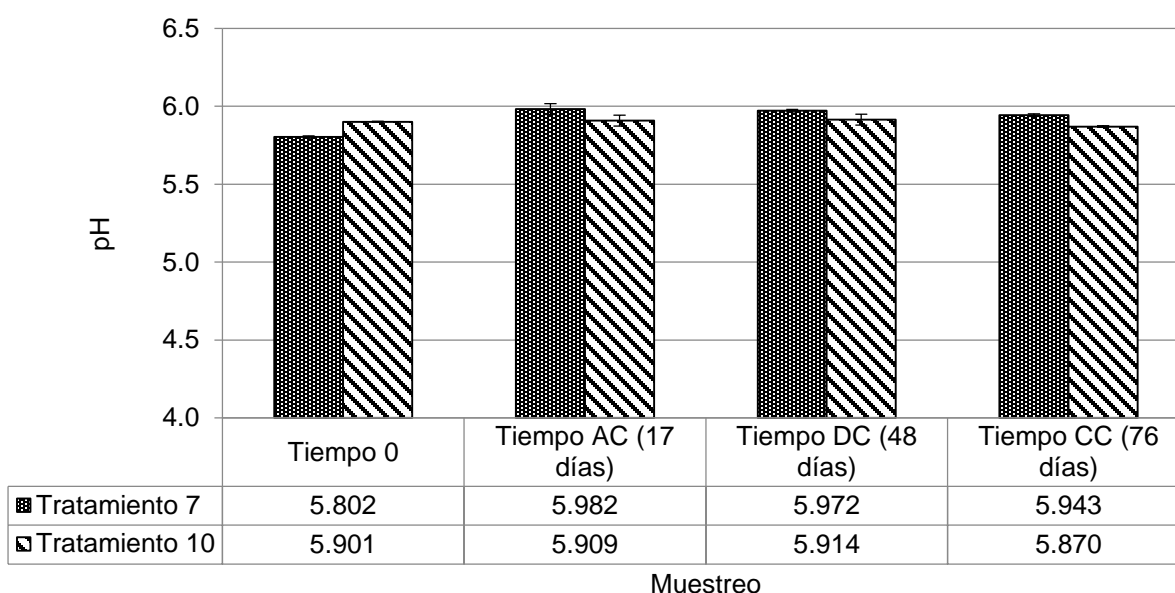


Figura 42. pH de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).

8.4.2.2. Actividad de lacasas

En el cuadro 16 se presenta la actividad de lacasas de *Pleurotus levis* (CP-30) cultivada en el tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M) y el tratamiento 10 (PDA+AAS 100 μ M+0.4 g). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 = 0.9$. Se realizó una cinética de la actividad enzimática en diferentes puntos donde el micelio creció en presencia del antraceno.

Los resultados muestran que el tratamiento 10 tuvo significativamente ($P \leq 0.05$) mayor actividad de lacasas comparado con el tratamiento 7 en el tiempo de CC (Anexo 11).

Cuadro 16. Actividad de lacasas ($U\ mL^{-1}$) de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS $100\ \mu M$ (Tratamiento 7) y PDA+AAS $100\ \mu M + 0.4\ g$ de antraceno (Tratamiento 10).

Muestreo y tiempo incubación	Blanco	Tratamiento 7	Tratamiento 10
Tiempo 0	0	0.195 ± 0.039 d	0.138 ± 0.048 d
Tiempo AC (17 días)		19.907 ± 0.470 bc	25.105 ± 5.629 abc
Tiempo DC (48 días)		40.755 ± 4.622 a	38.330 ± 3.671 ab
Tiempo CC- (76 días)		13.634 ± 1.679 cd	42.005 ± 6.931 a
Tiempo CC+ (76 días)	0	6.843 ± 1.054 cd	35.423 ± 4.634 ab

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 la actividad de lacasas fue de $0.24\ U\ mL^{-1}$ en el tratamiento 7 y $0.169\ U\ mL^{-1}$ en el tratamiento 10; en el tiempo AC no hubo diferencia significativa entre el tratamiento 7 y 10, pero el tratamiento 10 ($25.105\ U\ mL^{-1}$) fue $6.39\ U\ mL^{-1}$ mayor que el tratamiento 7 ($19.907\ U\ mL^{-1}$); en el tiempo DC no hubo diferencia significativa entre el tratamiento 7 y 10, aunque el tratamiento 7 ($40.755\ U\ mL^{-1}$) fue $2.98\ U\ mL^{-1}$ mayor que el tratamiento 10 ($38.33\ U\ mL^{-1}$); en el tiempo CC- hubo diferencia significativa entre el tratamiento 7 y 10, el tratamiento 10 ($42.005\ U\ mL^{-1}$) fue $34.86\ U\ mL^{-1}$ mayor que el tratamiento 7 ($13.634\ U\ mL^{-1}$) y en el tiempo CC+ se presentó diferencia significativa entre el tratamiento 7 y 10, en donde el tratamiento 10 ($35.423\ U\ mL^{-1}$) fue $35.12\ U\ mL^{-1}$ mayor que el tratamiento 7 ($6.843\ U\ mL^{-1}$). En el tiempo de colonización completa se observó una diferencia significativa entre ambos tratamientos, fue mayor la actividad en el tratamiento en el tiempo CC-, donde el micelio se encuentra en presencia de $0.4\ g$ de antraceno en la parte donde se adicionó el inóculo (Figura 43).

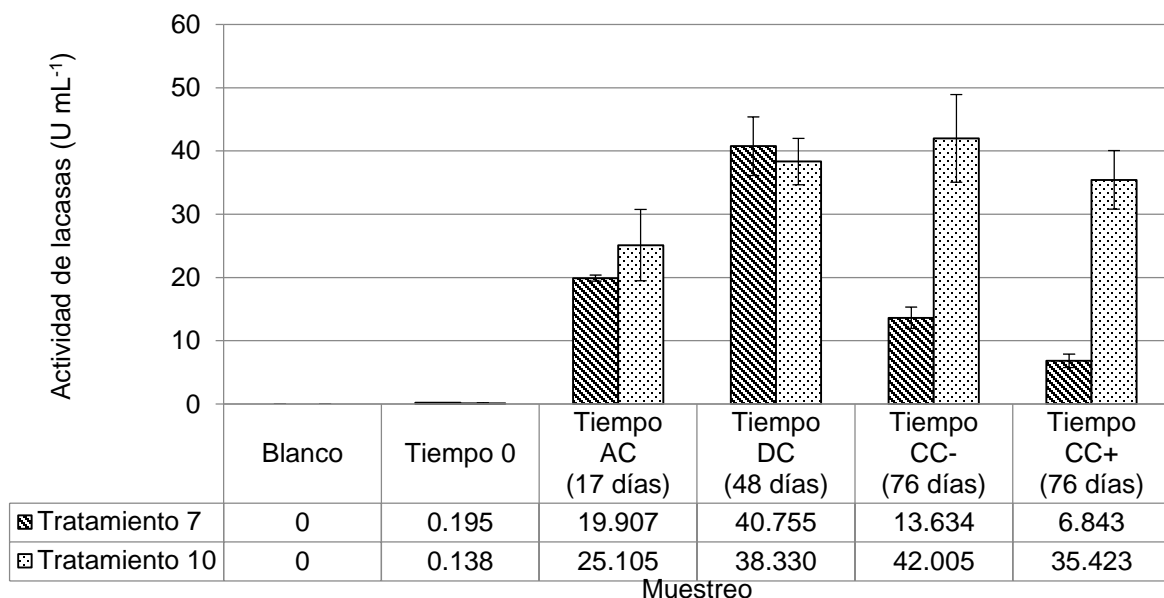


Figura 43. Actividad de lacasas de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).

8.4.2.3. Actividad de manganeso peroxidasas

En el cuadro 17 se presenta la actividad de MnP de *P. levis* (CP-30) para el tratamiento 7 (PDA+AAS 100 μ M) y el tratamiento 10 (PDA+AAS 100 μ M+0.4 g). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 = 0.92$. Se realizó una cinética de la actividad enzimática en los diferentes puntos donde el micelio se encontró con el antraceno. No se observó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el tratamiento 7 y 10 a lo largo de la cinética, sin embargo si se presentó diferencia significativa entre el tiempo AC y los tiempos finales del muestro (Anexo 12).

Cuadro 17. Actividad de MnP ($U L^{-1}$) de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10).

Tiempo de incubación	Blanco	Tratamiento 7	Tratamiento 10
Tiempo 0	0	0 \pm 0 f	0 \pm 0 f
Tiempo AC (17 días)		0.205 \pm 0.005 ab	0.215 \pm 0.007 a
Tiempo DC (48 días)		0.053 \pm 0.007 ef	0.101 \pm 0.014 cde
Tiempo CC- (76 días)		0.106 \pm 0.006 cde	0.071 \pm 0.018 def
Tiempo CC+ (76 días)	0	0.133 \pm 0.014 bcd	0.176 \pm 0.038 abc

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

En el tiempo 0 la actividad de MnP fue de 0 U L⁻¹ en ambos tratamientos; en cambio el tiempo AC aunque fue mayor la actividad, no presentó diferencia significativa entre ambos tratamientos, el tratamiento 10 (0.216 U L⁻¹) fue 0.01 U L⁻¹ mayor que el tratamiento 7 (0.205 U L⁻¹); en el tiempo DC no se presentó diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero el tratamiento 10 (0.101 U L⁻¹) fue 0.046 U L⁻¹ mayor que el tratamiento 7 (0.053 U L⁻¹); en el tiempo CC- no se observó tampoco diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero el tratamiento 7 (0.106 U L⁻¹) fue 0.035 U L⁻¹ mayor que el tratamiento 10 (0.071 U L⁻¹) y en el tiempo CC+ la diferencia significativa fue nula entre ambos tratamientos, pero el tratamiento 10 (0.176 U L⁻¹) fue 0.043 U L⁻¹ mayor que el tratamiento 7 (0.133 U L⁻¹). En el tiempo de colonización completa no se observó una diferencia significativa entre el CC- y CC+. La mayor actividad de MnP se presentó en el tratamiento 10 del tiempo AC, donde el micelio aun no hizo contacto con el antraceno, se observó que al entrar en contacto el micelio con el antraceno disminuyó la actividad enzimática de MnP y en el tiempo CC+ presentó un incremento donde se encuentra el micelio en desarrollo y en contacto con el antraceno (Figura 44).

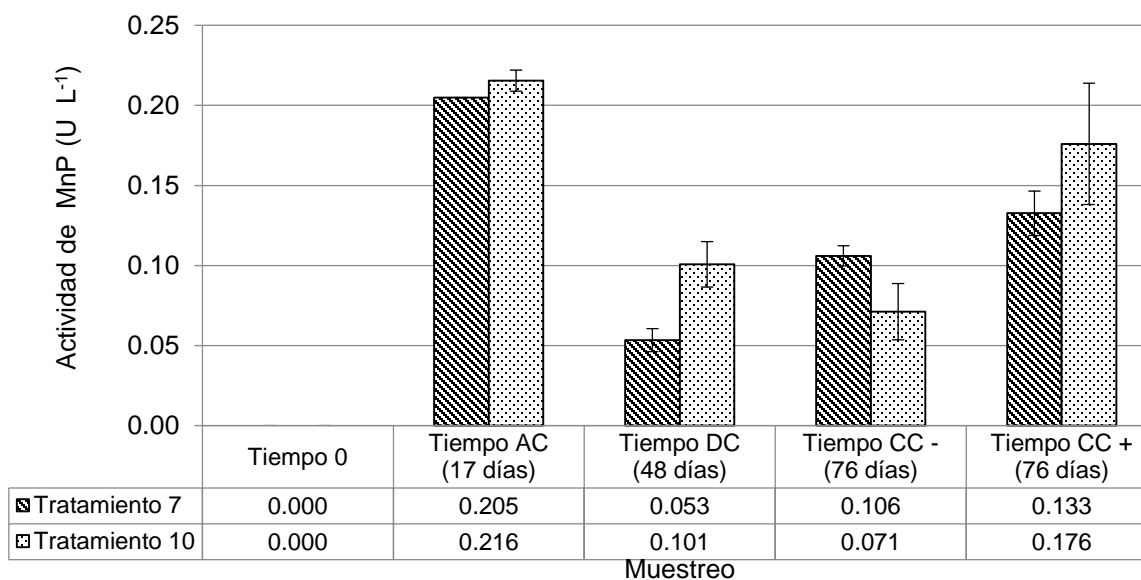


Figura 44. Actividad de MnP de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno (Tratamiento 10). AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno, CC-= Colonización completa sin presencia de antraceno, CC+= Colonización completa de la colonia en presencia de antraceno (n=3).

8.4.3. Tratamiento 7 y 11

8.4.3.1. Actividad de lacasas

En la figura 45 se muestra el crecimiento de *P. levis* (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11). Se observa una colonia con crecimiento abundante, blanca y densa, capaz de crecer en contacto con el antraceno colocado sobre el micelio (Tratamiento 11).

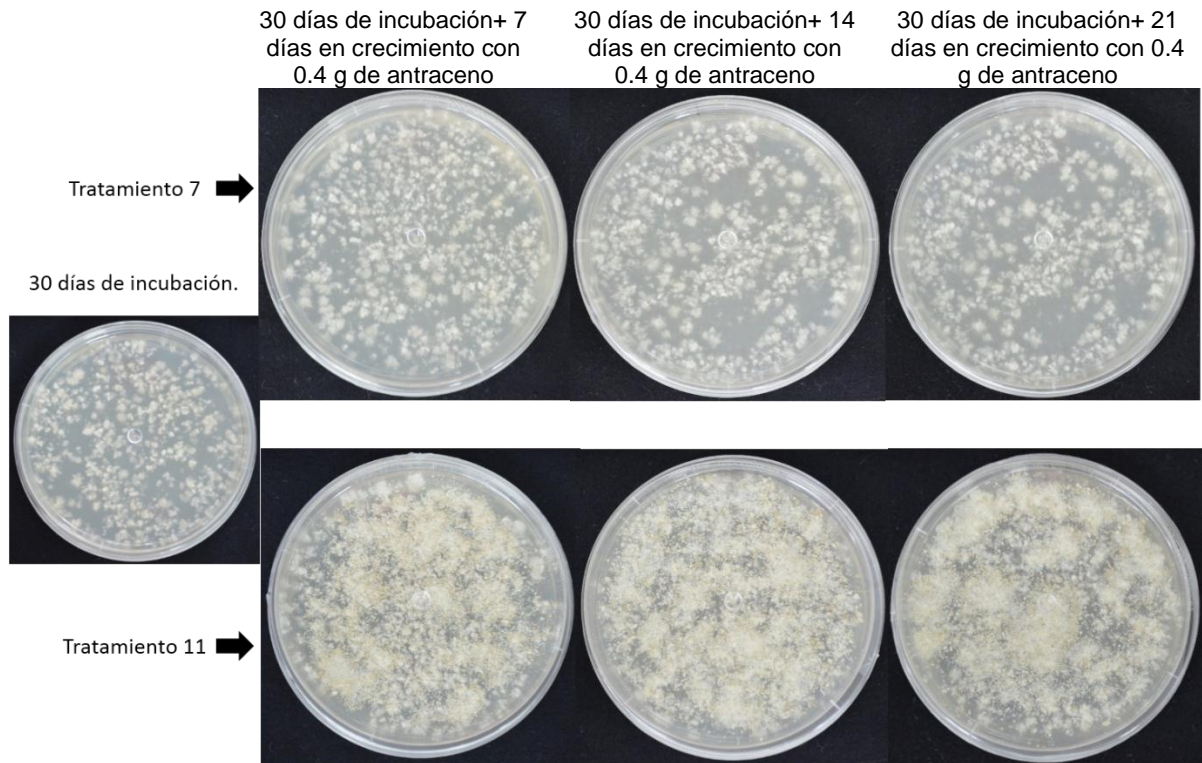


Figura 45. Crecimiento de *Pleurotus levis* (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS 100 μM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11).

En el cuadro 17 se muestra la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) cultivada en los tratamientos 7 (PDA+AAS 100 μM) y el tratamiento 11 (PDA+AAS 100 μM +0.4 g de antraceno) después de 30 días de incubación. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 0.86$ (Anexo 13). En el día 0 sólo se tomaron muestras del tratamiento 7, el cual presentó 0.04 U mL^{-1} , a los 30 días de incubación el tratamiento 7 presentó una actividad de 86.568 U mL^{-1} . A

partir de este tiempo se esparció el antraceno sobre la colonia desarrollada y 7 días después haber adicionado el antraceno sobre el micelio desarrollado, no se presentó diferencia significativa entre el tratamiento 7 y el 11. El tratamiento 11 (42.552 U mL⁻¹ de lacasas) presentó una actividad de 7.3 U mL⁻¹ mayor que el tratamiento 7 (35.253 U mL⁻¹) a los 14 días de colocado el antraceno, no habiendo diferencia significativa entre los tratamientos 11 y 7. El tratamiento 7 con 88.011 U mL⁻¹ fue 12.98 U mL⁻¹ mayor que el tratamiento 7 (75.029 U mL⁻¹) y a los 21 días después de colocado el antraceno, no se observó diferencia significativa entre ambos tratamientos en ese momento, sin embargo, el tratamiento 11 (50.095 U mL⁻¹) presentó 10.07 U mL⁻¹ más que el testigo (40.026 U mL⁻¹). Se presentó mayor actividad a los 14 días de haber colocado el antraceno a la colonia (Cuadro 18).

Cuadro 18. Actividad de lacasas (U mL⁻¹) de *Pleurotus levis* (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS 100 µM (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 µM+0.4 g de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11) (n=3).

Tiempo de incubación	Blanco	Tratamiento 7	Tratamiento 11
0 días	0	0.04±0.008 d	Sin muestreo
30 días		86.568±8.356 a	Sin muestreo
30 días + 7 días en crecimiento con antraceno		35.253±6.416 dc	42.552±9.814 ac
30 días + 14 días en crecimiento con antraceno		88.011±6.224 a	75.029±7.505 ab
30 días + 21 días en crecimiento con antraceno	0	40.026±8.121 bc	50.095±11.022 abc

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una P≤0.05.

Se observó que después de 7 días de haber adicionado el antraceno en el tratamiento 11 disminuyó la actividad de lacasas un 50.8% y en el tratamiento 7 un 59.3%, después de 14 días se produjo un aumento del 76.3% en el tratamiento 11 y de 149.7% en el tratamiento 7, y a de 21 días volvió a disminuir la actividad en el tratamiento 11 un 33.2% y en el tratamiento 7 un 54.5% (Figura 46). Presentándose la mayor actividad de lacasas en el tratamiento 7 ha los 14 días de incubación después de haber adicionado el antraceno al tratamiento 11.

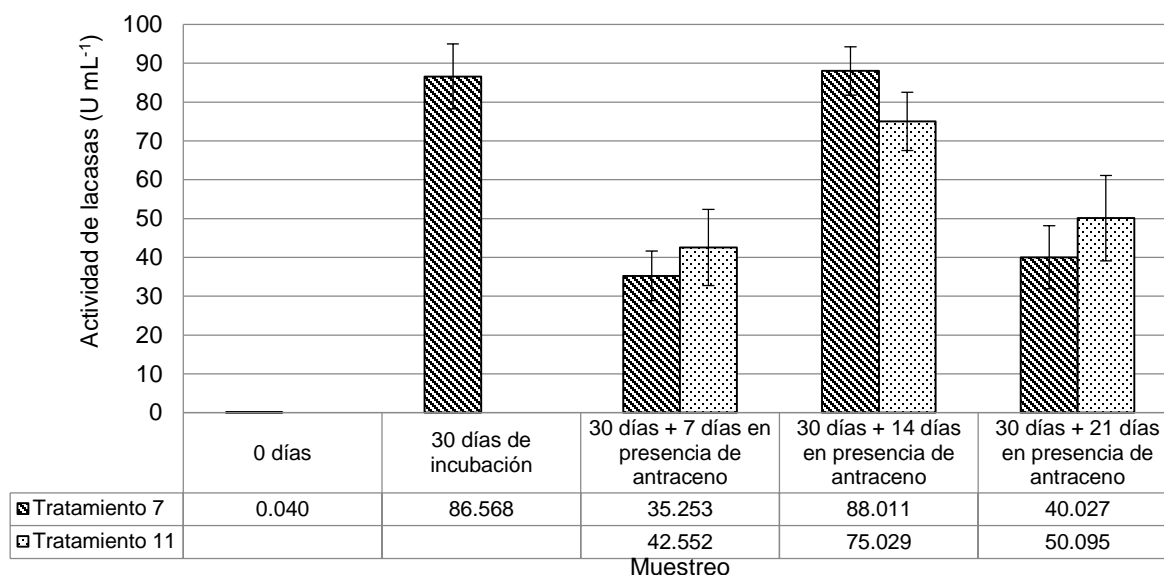


Figura 46. Actividad de lacasas de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M+0.4 g de antraceno (Tratamiento 11) (n=3).

8.4.3.2. Actividad de manganeso peroxidasas

En el cuadro 19 se muestra la actividad de MnP de *P. levis* (CP-30) usando inóculo homogeneizado a 30 días de incubación en toda la superficie de la caja de Petri en PDA+AAS 100 μ M (Tratamiento 7) y PDA+AAS 100 μ M con 0.4 g de antraceno esparcido sobre la colonia cultivada por 30 días de incubación (Tratamiento 11). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $F < 0.0001$ y $R^2 0.98$ (Anexo 14). En el día 0 sólo se tomaron muestras del tratamiento 7 el cual presentó 0 U L⁻¹ y a los 30 días de incubación el tratamiento 7 presentó una actividad de 0.199 U L⁻¹, a los 7 días de incubación de la colonia con el antraceno se presentó una diferencia significativa entre los tratamientos 7 y 11. El tratamiento 7 (0.255 U L⁻¹) presentó una actividad de 0.11 mL⁻¹ mayor que el tratamiento 11 (0.146 U L⁻¹), a los 14 días no hubo diferencia significativa entre el tratamiento 11 (0.564 U L⁻¹) y el tratamiento 7 (0.559 U L⁻¹) y, a los 21 días tampoco se observó diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero el tratamiento 11 (0.15 U L⁻¹) fue 0.07 U L⁻¹ mayor que el tratamiento 7 (0.077 U L⁻¹). La mayor actividad de MnP se presentó en el tratamiento 7 a los 14 días y para el tratamiento 11 a los 21 días después de colocado el antraceno en la colonia.

Cuadro 19. Actividad enzimática de MnP ($U L^{-1}$) de *Pleurotus levis* (CP-30) sembrada con inóculo homogeneizado en toda la caja de Petri utilizado medio de cultivo PDA+AAS $100 \mu M$ (Tratamiento 7) y PDA+AAS $100 \mu M + 0.4 g$ de antraceno esparcido en la colonia (Tratamiento 11) ($n=3$).

Tiempo de incubación	Blanco	Tratamiento 7	Tratamiento 11
0 días	0	0 ± 0 e*	Sin muestreo
30 días		0.199 ± 0.034 bc	Sin muestreo
30 días + 7 días en crecimiento con antraceno		0.255 ± 0.009 b	0.146 ± 0.007 cd
30 días + 14 días en crecimiento con antraceno		0.559 ± 0.026 a	0.564 ± 0.018 a
30 días + 21 días en crecimiento con antraceno	0	0.077 ± 0.011 ed	0.150 ± 0.037 bcd

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Se observó que después de 7 días de haber adicionado el antraceno en el tratamiento 11 disminuye la actividad de MnP un 26.6% y aumenta en el tratamiento 7 un 28%, después de 14 días se produjo un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en los dos tratamientos, en el tratamiento 11 el incremento fue de 286% y de 119% en el tratamiento 7, y después de 21 días disminuyó la actividad en el tratamiento 11 un 73.4% y en el tratamiento 7 la disminución fue de 86.2% (Figura 47). Se reporta la mayor actividad de MnP en el tratamiento 11 a los 14 días de incubación después de haber adicionado el antraceno a la colonia.

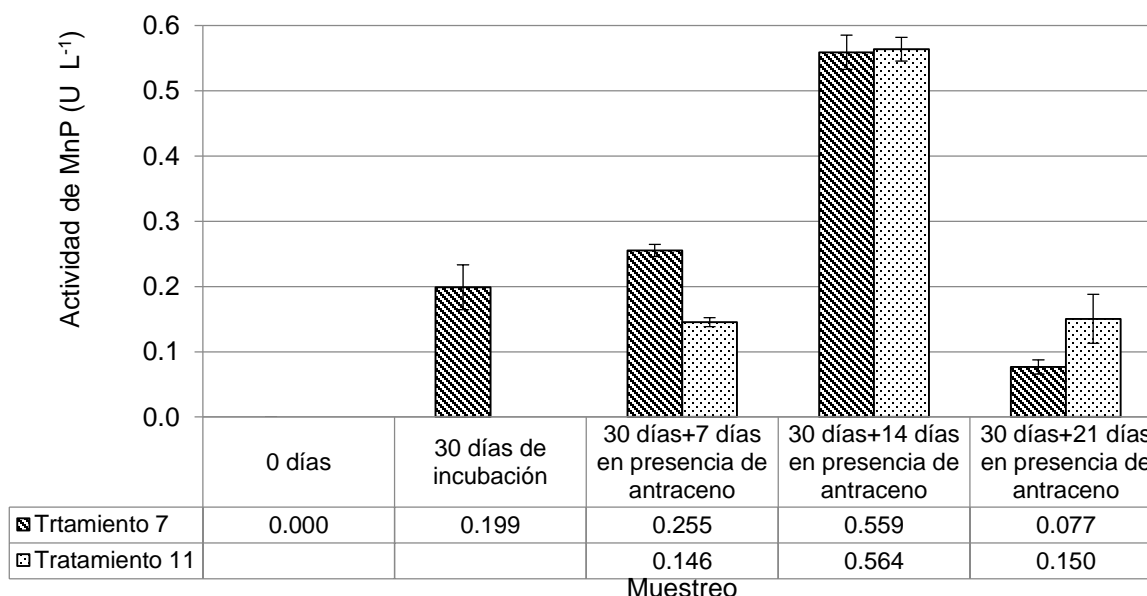


Figura 47. Actividad de MnP de *Pleurotus levis* (CP-30) en medio de cultivo semisólido PDA+AAS $100 \mu M$ (Tratamiento 7) y PDA+AAS $100 \mu M + 0.4 g$ de antraceno distribuido sobre la colonia desarrollada después de 30 días (Tratamiento 10) ($n=3$).

8.5. Discusión

La literatura reporta que los hongos de la podredumbre blanca, así como sus extractos extracelulares tienen la capacidad potencial para la degradación de HAPs, razón por la cual representan una alternativa para la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Clemente *et al.*, 2001).

Muchos basidiomicetos, incluyendo las especies del género *Pleurotus*, son hongos saprofitos con habilidades para crecer en suelos contaminados y secretar las enzimas del sistema ligninolítico que participan en la degradación de algunos compuestos contaminantes (Cerniglia y Sutherland, 2010).

Spezzia (2013), seleccionó 15 cepas de hongos comestibles de los géneros *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lentinula* y *Coprinopsis*, capaces de producir lacasas, dentro de las cuales obtuvieron mayor actividad las cepas del género *Pleurotus*, incluyendo a *P. levis* (CP-30) con una actividad de lacasas de 1 000 U mL⁻¹ en medio de cultivo líquido extracto de malta EMB adicionado con CuSO₄ 0.1 mM. Los resultados en este trabajo mostraron que *P. levis* presentó un aumento considerable de enzimas al adicionar ácido acetilsalicílico (AAS) en una concentración de 100 µM utilizando inóculo homogeneizado, lo que representó un incremento de la actividad del 37.81% con respecto al testigo (sin ácido). Por lo que el ácido acetyl salicílico pudo funcionar como mediador para inducir la actividad enzimática.

En comparación con los resultados obtenidos con *P. ostreatus* (CP-754) el comportamiento de la producción de lacasas fue similar, se incrementa la actividad cuando se encuentra en presencia de antraceno y fue mayor en el lado donde no está presente el antraceno, sin embargo, en los ensayos con *P. ostreatus* (CP-754) no se presenta diferencia significativa (Tukey a una P≤0.05) entre los tratamientos y el testigo por lo que no hay un efecto estimulante del antraceno en la actividad de lacasas. Cabe destacar que la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) es 3.4 veces mayor que la de *P. ostreatus* (CP-754) bajo las mismas condiciones.

Los ensayos realizados por Camacho-Martínez (2013), con *P. ostreatus* (CP-50) en medio de cultivo EMA en presencia de 0.4 g de antraceno pero sin la adición de AAS mostraron que la actividad de lacasas de la cepa CP-50 se comportó diferente que *P. ostreatus* (CP-754) y que *P. levis* (CP-30). En la cepa CP-50 la mayor actividad

de lacasas se presentó en el tiempo AC (32.67 U mL^{-1}) y decreció al entrar en contacto con el antraceno y cuando colonizó toda la colonia (3.75 U mL^{-1}) incremento la actividad ligeramente en el lado donde se encuentra el antraceno (15.64 U mL^{-1}), en cambio en *P. levis* el antraceno incrementó la actividad de lacasas y se presentó mayor actividad en la parte donde no se encuentra el antraceno. Diferentes hongos productores de lacasas excretan diferentes formas de lacasas debido a la suplementación de compuestos aromáticos (Cohen *et al.*, 2002). Por lo que el antraceno presenta un compuesto que evidencia un efecto positivo en la producción de lacasas.

La actividad de lacasas de *P. levis* en el tiempo de colonización completa (42.005 U mL^{-1}) coincide con los rangos de los valores obtenidos por Bezalel *et al.* (1996) de *P. ostreatus* en presencia de HAPs, en donde la actividad de lacasas presentó niveles de 46 U mL^{-1} en medio de cultivo rico para basidiomicetes (BSM) con catecol, 57 U mL^{-1} en medio de cultivo BSM con fenantreno y 58 U mL^{-1} en medio de cultivo BSM con pireno.

Guillén-Navarro *et al.* (1998), obtuvieron 0.0307 U mL^{-1} de enzimas lacasas y 0.41 U L^{-1} de MnP en medio de cultivo líquido y en medio de cultivo sólido obtuvieron 0.015 U g^{-1} de lacasas y 0.809 U g^{-1} de MnP de *P. ostreatus*. En comparación en *P. levis* la mayor actividad enzimática de lacasas que se registro fue de 49.8 U mL^{-1} en medio EMA con AAS 100 lo cual es mayor que lo obtenido por Guillén-Navarro *et al.* (1998). En el caso de MnP la actividad de *P. levis* fue menor con 0.205 U L^{-1} en medio de cultivo PDA con AAS 100. Vyas y Molitoris (1995) evaluaron la producción de estas enzimas por *P. ostreatus* en fermentación sólida en paja y obtuvieron una actividad enzimática máxima de lacasas de 0.015 U g^{-1} y de 0.809 U g^{-1} de manganeso peroxidasa, en comparación con *P. levis* la actividad enzimática de lacasas fue mayor, pero la actividad de MnP fue menor. García-Delgado *et al.* (2013), determinó la actividad de *P. ostreatus* obteniendo una actividad de 1.07 U g^{-1} de lacasas y 0.112 U g^{-1} de MnP, valores menores que los obtenidos por *P. levis* (CP-30).

Ramírez *et al.* (2003), reportó valores de 20 U mL^{-1} de actividad de lacasas utilizando *P. ostreatus* en un sustrato de vinaza y salvado de trigo. También Manjares *et al.* (2010) reportó que *P. ostreatus* produce mayor cantidad de lacasas (19.4 U mL^{-1}

1) en el día 24 de cultivo utilizando como sustrato cáscara de plátano maduro y suplementado con bagazo de caña. Hublik y Schinner (2000) obtuvieron valores de 2.5 U mL^{-1} de lacasas de *P. ostreatus* usando siringaldazina. Siendo estos valores menores que los obtenidos por *P. levis* por lo que se puede observar que el ácido acetyl salicílico tiene un mayor efecto en la actividad enzimática *in vitro*.

Estudios realizados por Márquez-Rocha *et al.* (2000), sobre la degradación de HAPs absorbido por *P. ostreatus* muestra que después de 21 días fue mineralizado el 68% de antraceno. Al igual Bogan *et al.* (1999), reportó la habilidad de *P. ostreatus* para degradar 80% de HAPs en suelo en 35 días.

Por lo que *P. levis* posee un potencial enzimático importante para su aplicación en procesos de biorremediación de suelos agrícolas para degradar contaminantes con alta toxicidad tales como los hidrocarburos poliaromáticos.

8.6. Conclusiones y perspectivas

P. levis (CP-30) se desarrolla rápidamente utilizando un inóculo homogeneizado, lo que permite que colonice más rápido el sustrato, incrementando las áreas de contacto del micelio con el posible contaminante obteniendo una mejor degradación. Fue mayor la velocidad de crecimiento en medio de cultivo PDA en comparación con medio EMA. La adición del ácido acetil salicílico 100 μM al medio PDA incrementó la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) un 38% y en medio EMA el contenido de proteínas se incrementó un 228 %, sin embargo no se presentó un incremento en el área de crecimiento y la velocidad de crecimiento. El lento desarrollo del micelio no estuvo relacionado proporcionalmente con la actividad enzimática. *Pleurotus levis* (CP-30) fue capaz de tolerar y desarrollarse en presencia AAS μM y de 0.4 g de antraceno, bajo esas mismas condiciones presentó una actividad de lacasas considerable. La mayor actividad de lacasas se presentó cuando colonizó por completo la caja de Petri en la parte CC- (42.005 U mL^{-1}) y la mayor actividad de MnP (0.215 U L^{-1}) se presentó antes de entrar en contacto el micelio con el antraceno. Al final de la cinética el antraceno estimuló la actividad de lacasas un 418 % y de MnP un 32.3%.

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que la especie silvestre *P. levis* (CP-30) representó un potencial enzimático alto, por lo que se deben de estudiar más a fondo la actividad enzimática de la CP-30, así como los mecanismo para estimular el desarrollo del micelio e incrementar la velocidad de crecimiento. Se sugiere encaminar la investigación a una escala en microcosmos para evaluar la actividad de *P. levis* (CP-30) en suelo agrícola y evaluar su capacidad de adaptarse a sustratos que han sido contaminados, así como el crecimiento del hongo sobre sustratos agrícolas para potencializar la degradación y fertilización de los suelos, ayudándoles a recuperar su capacidad de producción, se recomienda realizar estudios *in vitro* y bioreactores con la finalidad de a futuro poder implementar esta tecnología *in situ* o *ex situ* en el campo, implementando potencializadores de la actividad enzimática como el ácido acetil salicílico para reducir los periodos de biorremediación. Debido a que México es un país megadiverso y que presenta una gran diversidad de hongos debe de enfocarse los trabajos de investigación al estudio de las especies silvestres y aprovechar estos recursos genéticos para beneficio de la sociedad.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. *In vitro* el ácido acetil salicílico (AAS) 100 μM incrementó la actividad de lacasas, MnP y LiP, por lo que se puede utilizar para potencializar la actividad enzimática en presencia de hidrocarburos poliaromáticos del petróleo.
2. La adición del ácido acetil salicílico 100 μM al medio EMA incrementó la actividad de lacasas de *P. levis* un 51% y el contenido de proteínas un 228 % y, en *P. ostreatus* incrementó la actividad de lacasas en un 349%, un 73% de MnP y un 22% de LiP.
3. La especie silvestre *P. levis* (CP-30) presentó una actividad de lacasas superior a *P. ostreatus* (CP-754) y *P. ostreatus* (CP-50). Siendo un recursos genético aprovechable para la biorremediación de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.
4. *P. levis* (CP-30) y *P. ostreatus* (CP-754) crecieron en presencia de altas concentraciones de antraceno (0.4 g).
5. La actividad de lacasas y de MnP de *P. levis* (CP-30) se vio estimulada por la presencia de antraceno.
6. Comparativamente la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) fue 3.4 veces mayor (42.005 U mL^{-1}) que la actividad de *P. ostreatus* (CP-754) bajo las mismas condiciones de AAS y antraceno (12.487 U mL^{-1}).
7. Se confirma que el recurso genético de *P. levis* presenta un potencial considerable para biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos.
8. A partir de los resultados obtenidos es factible plantear una estrategia para la restauración de los suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo, a partir de la participación de diferentes actores que lleven a cabo actividades para la producción del inóculo de la cepa silvestre *P. levis* (CP-30) y la cepa comercial (CP-754).

X. PROPUESTA DE ESTRATEGIA PARA BIORREMIEDIAR SUELOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO *P. levis*

10.1. Introducción

Las zonas industriales y los sitios de explotación petrolera y minera son aquellos que han originado contaminación en diversos puntos del país. Aunado a lo anterior se incrementa el riesgo y la problemática, en cuanto se ven abandonados los sitios. Dicha actividades no solo afectan el uso sustentable del suelo y el desarrollo urbano, sino que también afecta la salud de la población, y en muchos casos, impacta negativamente a recursos naturales estratégicos y fundamentales para el desarrollo como lo es la disponibilidad de agua para el consumo humano (SEMARNAT, 2012).

Las actividades de remediación y rehabilitación de sitios contaminados, contribuye al desarrollo sustentable del país a través de los siguientes aspectos básicos: i) permite eliminar contaminantes que representan riesgos para el ambiente, los recursos naturales y la salud humana, ii) permite recuperar el valor del suelo para reintegrar los valores monetario, funcional y social al desarrollo sustentable de los núcleos poblacionales, iii) permite reintegrar las áreas remediadas y revitalizadas a los ciclos económicos regionales, mejorando a través de ello la calidad de vida de la población y iv) permite proteger los recursos naturales (suelo y agua) y la salud humana al eliminar riesgos por la contaminación (SEMARNAT, 2012).

La biorremediación de suelos contaminados es una técnica de tratamiento que tiene como objetivo utilizar el potencial de la microbiota autóctona o exógena, para degradar los compuestos orgánicos constituyentes de los residuos, con la consecuente disminución de la toxicidad. Esta tecnología es, en general, eficiente y económica cuando se compara con las alternativas físicas y fisicoquímicas convencionales de tratamiento de suelos (Ferreira *et al.*, 2013).

El género *Pleurotus* comprende especies de hongos con aplicaciones potenciales en biorremediación. El sistema ligninolítico de este grupo de hongos está compuesto por enzimas oxidativas no específicas que degradan compuestos con estructuras similares a la lignina dentro de los cuales se encuentran los HAPs. Las enzimas más sobresalientes capacidad para degradar son lacasas, MnP y LiP. Estas

enzimas son interesantes para su aplicación en la biorremediación, además de que pueden ser usadas de manera segura en muchas condiciones.

El desarrollo de las especies del genero *Pleurotus* requiere de la utilización de residuos agroindustriales que sirvan como soporte para el crecimiento y desarrollo de los hongos y su potencial enzimático. El bagazo de la caña de azúcar y la pulpa de café, son dos subproductos generados por la actividad agroindustrial en México, potencialmente utilizables para la producción rural de los hongos comestibles. La mayor producción de estos subproductos (72.7% del bagazo y el 87.4% de la pulpa de café) se concentró en la región sureste del país, elevando así su potencial para la producción rural de los hongos comestibles partir de dichos subproductos (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

En la presente estrategia plantea la producción y aplicación de inóculos de hongos del genero *Pleurotus* en suelos agrícolas para atenuar los compuestos tóxicos derivados del petróleo. La cual se basa en el potencial enzimático para degradar compuestos poliaromáticos del petróleo.

Para conocer los recursos con que se cuentan para la elaboración de una propuesta de estrategia se realizó una matriz de potencialidades, limitaciones y problemas (Cuadro 20).

Cuadro 20. Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas.

Área temática	Potencialidades	Limitaciones	Problemas
Recursos naturales y ambientales	Cepas de <i>Pleurotus</i> comerciales y nativas con potencial enzimático para remediar suelos agrícolas.	Falta de conocimiento de las especies nativas con potencial enzimático.	No se aprovecha los recursos genéticos con potencial para la biorremediación.
Sistema físico-natural	Suelos agrícolas fértiles. Residuos agrícolas aprovechables para la producción de hongos.	Hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) del petróleo, compactan el suelo, modifican el pH y por su toxicidad reducen la fertilidad de los suelos. Reducen la capacidad del suelo para retener agua para las plantas.	Problemas de contaminación con hidrocarburos en suelos agrícolas en México. Pérdida de suelos fértiles para la producción de alimentos.

Área económica	Existencia de mercado para la comercialización de hongos comestibles. Precios accesibles de inóculo de hongos. Residuos agroindustriales de bajo costo.	Poco interés por la producción de especies nativas de hongos.	Baja producción y aprovechamiento del recurso genético de hongos.
Demografía y mercado de trabajo	Población agrícolas Zonas petroleras cercanas a suelos de uso agrícolas.	Pocas oportunidades de empleo. Migración. Enfermedades por la presencia de HAPs en suelos agrícolas.	Consecuencias negativas para la salud humana por contaminación de HAPs
Infraestructura	Espacios accesibles para la producción de hongos.	Falta de conocimiento sobre tecnologías para la producción de hongos y para la biorremediación de suelos usando hongos.	Falta de infraestructura y conocimiento adecuado para la producción de inóculos con hongos con potencial para degradar contaminantes.
Aspectos institucionales	Planes de desarrollo para la producción de hongos. Normas mexicanas para la regulación de contaminantes en México.	Falta de seguimientos a los sitios contaminados. Poco conocimiento de las normas	Falta de prevención y sanciones por parte de las instituciones.

10.2. Actores sociales

El proceso de biorremediación requiere del intercambio y el trabajo coordinado de los diferentes actores involucrados en el proceso de remediación. Para los actores involucrados son de importancia los aspectos de responsabilidad acerca de la contaminación del suelo, la eliminación de los riesgos y la protección a la salud. A continuación se describen los principales actores implicados (Figura 48).

1. La comunidad afectada: Son los campesinos propietarios de los suelos agrícolas afectados por la contaminación de hidrocarburos del petróleo. Quienes tienen la responsabilidad de estar conscientes de los riesgos de la contaminación y de participar en las acciones necesarias para minimizar los riesgos.

2. Responsables de la contaminación: son todas las personas o figuras que están involucradas en los problemas de contaminación, ya sea de forma accidental o

imprudencial. Tiene como responsabilidad la remediación y eliminación de los riesgos a la salud del público.

3. Las Instituciones gubernamentales: Son las instituciones encargadas de regular, administrar, gestionar soluciones relacionadas con los problemas de contaminación. Por ejemplo CONAGUA, COFEPRIS, PROFEPA, SEMARNAT, PEMEX, CNH. Tienen una corresponsabilidad por los procesos de gestión administrativa (en cuanto al cumplimiento de las disposiciones legales) y la responsabilidad por la protección de los recursos naturales y la protección de la salud humana.

4. La comunidad científica: Tienen que dar informaciones científicas y apoyar así el proceso de minimizar el riesgo para la salud. Tienen que proporcionar los servicios necesarios complementarios para formar recursos humanos calificados y competitivos en todos los campos de la formación, así como en lo referente a la investigación y desarrollo (I+D) y de transferencia de tecnología.

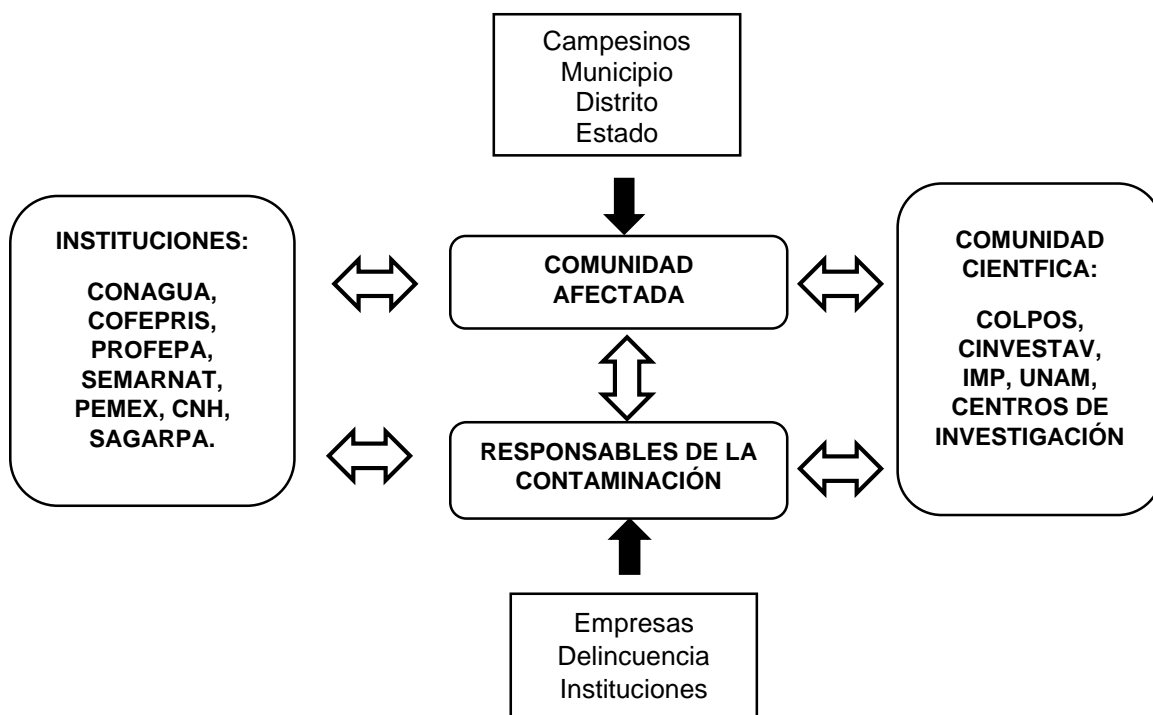


Figura 48. Actores principales de la problemática de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos.

10.3. Objetivos estratégicos y específicos

En el cuadro 21 se presenta los objetivos, resultados y actividades principales que conlleva la propuesta de estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.

Cuadro 21. Asignación de objetivos de la estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.

OBJETIVO GENERAL	Biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos del petróleo en México.
OBJETIVO ESPECIFICO	Aprovechar el potencial de los hongos para biorremediación. Restaurar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos y mejorar la calidad de vida de las familias agrícolas afectadas.
RESULTADOS	1. Suelos agrícolas libres de contaminación. 2. Desarrollo de técnicas para biorremediación de suelos contaminados <i>in situ</i> . 3. Manual para el cultivo de hongo con potencial para biorremediar suelos agrícolas.
ACTIVIDADES	1. Experimentación en microcosmos para evaluar la producción enzimática en suelo. 2. Determinación de la expresión genética de <i>P. levis</i> . 3. Evaluación de diferentes sustratos sólidos suplementados con ácido acetil salicílico para la producción de enzimas. 4. Diseños de técnicas para su aplicación <i>in situ</i> (Bioreactores y Biopilas). 5. Elaboración de manuales para la recuperación de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos usando hongos.

XI. LITERATURA CITADA

- Ballaminut, N. y D. R. Matheus. 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal Microbiology* 38: 248-252.
- Bennett, R. N. y R. M. Wallsgrave. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley Review No. 72. *New Phytology* 127: 617–633.
- Bezalel, L., Yitzhak H. y Cerniglia C. E. 1996. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(1): 292–295.
- Bisang, R., M. Campi y V. Cesa. 2009. Biotecnología y desarrollo. Colección documentos de proyectos. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) Santiago de Chile.
- Blanch, A. R. 2010. Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. *Nota d'economia* 97-98: 183-198.
- Bogan, B. W., R. T. Lamar, W. D. Burgos y M. Tien. 1999. Extent of humification of anthracene, fluranthene, and benzo(a)pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letter in Applied Microbiology* 28: 250-25.
- Bolívar-Zapata, F. G. 2003. Recomendaciones para el desarrollo y consolidación de la Biotecnología en México. CONACYT, AMC y UNAM, México D. F. 154 pp.
- Botello, A.V. 2005. Características composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. Pp. 261–268. *In: Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Eds. A.V. Botello, J. Rendón Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández. 2ª ed. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México.
- 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, D. Leech, y B. Freiermuth. 1998. Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification. *TAPPI Biological Science Symposium* 19(23): 335-338.
- Camacho-Martínez, F. J. 2013. Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: Efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. 88 pp.
- Castanera, R, G. Pérez, A. Omarini, M. Alfaro, A. G. Pisabarro, V. Faraco, A. Amore y L. Ramírez 2012. Transcriptional and Enzymatic Profiling of *Pleurotus ostreatus* Laccase Genes in Submerged and Solid-State Fermentation Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 78(11): 4037–4045.
- Castro-Carrillo, L. A., J. Delgadillo-Martínez, R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón. 2008. Remoción de fenantreno por *Azolla caroliniana* utilizando bioaumentación con microorganismos hidrocarbonoclastas. *Interciencia* 33(8):591-597.
- Cerniglia, C. E. y J. B. Sutherland. 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. Pp. 2080-2110. *In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Ed. K. N. Timmies. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

- Clemente, A. R., T. A. Anazawa y L. R. Durrant. 2001. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Soil Fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 255-261.
- Cohen, R., L. Persky y Y. Hadar. 2002. Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 58: 582–594.
- Collins, P. J., J. M. 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(12): 4563-4567.
- Contreras-Araneda, P. A. 2005. Suelos Contaminados con Hidrocarburos: RNA 16s como Indicador de Impacto. Memoria para obtener el título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. 75 pp.
- Díaz, G. I. A. R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Tesis de maestría en ciencias en biotecnología aplicada. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-IPN Tlaxcala. 108 pp.
- Díaz, M. M. E. 2012. *Casuarina equisetifolia* en la fitorremediación de suelo contaminado con diesel y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. Tesis de Maestría en Edafología. Colegio de Posgraduados Campus Montecillo. 109 pp.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Colección FAO Agricultura. Número 35. Roma Italia. 163 pp.
- Fernández, S. J. M., A. G. M. L. Ruíz y R. Rodríguez-Vázquez. 1998. La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. *Avance y Perspectiva. CINVESTAV-IPN* 17: 293-302.
- Ferreira, Do N. T. C., F. J. Santos Oliveira y F. Pessoa De Franca. 2013. Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revistas Internacional de Contaminación Ambiental* 29(1): 21-28.
- García-Delgado, C., N. Jiménez-Ayuso y E. Eymar. 2013. Selección de residuos de la producción de setas comestibles para biodegradación de contaminantes orgánicos persistentes. Pp. 2017-2022. *In: VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas: Innovar y Producir para el Futuro*. Eds. A. Téllez, F. Masaguer Rodríguez, A. Mariscal Sancho, I. Villarroel Robinson, M. Ruiz-Altisent, M. Riquelme Ballesteros, F. Correa Hernando y E. Cristina. Fundación General de la Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Goltapeh, E.M., D. Y. Rezaee y A. Varma. 2013. Introduction to Bioremediation; Capítulo 1. Pp. 5-15. *In: Fungi as Bioremediators*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Gómez, J. W. A. 2009. Evaluación de la atenuación natural estimulada en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina–diesel a escala de laboratorio. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín Facultad De Ciencias. Medellín, Colombia. 74 pp.
- Guillén-Navarro, G. K., F. J. Márquez-Rocha y J. E. Sánchez-Vázquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 302-306.

- Hublik, G. y F. Schinner. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 330–336.
- Huerta, G., D. Martínez-Carrera; J. E. Sánchez y H. Leal-Lara. 2009. Grupos de intersterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista Mexicana de Micología* 30: 31-42.
- Janusz, G, K. H. Kucharzykb, A. Pawlika, M. Staszczaka y A. J. Paszczynski. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 52: 1-12.
- Jeon, J. R., P. Baldrian, K. Murugesan y Y. S. Chang. 2011. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from *in vivo* biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial Biotechnology* 5(3): 318–332.
- Klessig, D. F. y J. Malamy. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439-1458.
- Korcan, S. E., I. H. Cigerci y M. Konuk. 2013. White-Rot Fungi in Bioremediation. Pp. 371-390. *In: Fungi as Bioremediators: An Introduction to Bioremediation*. Eds. E.M. Goltapeh, D. Y. Rezaee y A. Varma. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kuhad, R. C., S. Kuhar, S. K. Kant y B. Shrivastava. 2013. Microorganisms and Enzymes Involved in Lignin Degradation Vis-à-vis Production of Nutritionally Rich Animal Feed: an Overview. Pp. 3-44. *In: Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Eds. R. C. Kuhad and A. Singh. Springer, India.
- Kuwahara, M., J. K. Glenn, M A. Morgan y M. H. Gold. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169: 247-250.
- López, A. y J. García. 2009. *Pleurotus levis*. Instituto de Genética Forestal, Universidad Veracruzana. *Funga Veracruzana* 103:1-4.
- López, T. R., V. Camacho Rodríguez y M. A. Gutiérrez Coronado. 1998. Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. *Terra Latinoamericana* 16(1): 43-48.
- Maldonado, A. Y. I. 2007. Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus spp.* por apareamiento de neohaplontes compatibles. Tesis de maestría en Ciencias en Bioprocesos, Instituto politécnico nacional IPN-UPIBI. México, D. F. 125 pp.
- Mancera, L. M. E., F. Esparza-García, B. Chávez-Gómez, R. Rodríguez-Vázquez, G. Saucedo-Castañeda y J. Barrera-Cortés. 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.
- Manjarrés, K., A. Castro y E. Rodríguez Sandoval. 2010. Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación* 2(7): 9-15.
- Márquez-Rocha, F. J., Hernández-Rodríguez V. Z., Vázquez-Duhalt R. 2000. Biodegradation of soil adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* 22: 469–472.
- Martín, M. C., A. González-Becerra y M. J. Blanco-Santos. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos.

- Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 103-120.
- Martínez-Anaya, C., E. Balcázar-López, E. Dantán-González y J. L. Folch-Mallol. 2008. Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 50(3-4): 119-131.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué, M. Aliphath, A. Aguilar, M. Bonilla y W. Martínez. 2000. La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT, México, D. F. 193-207 pp.
- Mata, G., R. Gaitán-Hernández y D. Salmones. 2007. Hongos comestibles en México, una industria en crecimiento. Pp. 39-48. *In: El Maravilloso mundo de los hongos*. Eds. R. Zuleta Rodríguez, D. Trejo Aguilar y A. R. Trigos Landa. Universidad Veracruzana. Xalapa Ver., México.
- Maté, D., R. E. García, S. Camarero y M. Alcalde. 2011. Directed Evolution of Fungal Laccases. *Current Genomics* 12(2): 113-122.
- Mathieu, Y, E. Gelhaye, S. Dumarçay, P. Gérardin, L. Harvengt y M. Buée. 2013. Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. *Journal of Microbiological Methods* 92:157-163.
- Mora, V. M. y D. Martínez-Carrera. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México, Capítulo 1.1. Pp. 7-26. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México, D.F.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez-Carrasco, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. de Lima, S. Villa, E. Montiel y D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo; Capítulo 7. Pp. 91-108. *In: 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.
- Mougin, C., C. Jolivalt, P. Briozzo y C. Madzak. 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters* 1:145-148.
- Mougin, C., H. Hassan Boukcim y C. Jolivalt. 2009. Soil Bioremediation Strategies Based on the Use of Fungal Enzymes; Capítulo 7. Pp. 123-149. *In: Advances in Applied Bioremediation, Soil Biology*. Eds. A. Singh, R. C. Kuhad y P. O. Ward. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ohga, S. y Y. Kitamoto. 1997. XVI Future of mushroom production and biotechnology. *Food Reviews International* 13(3): 461-469.
- Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso y S. Giovani. 1997. A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.
- PEMEX. 2013. Informe Anual 2013 de Petróleos Mexicanos. México, D. F. 116 pp.
- PEMEX. 2014. Primer informe trimestral 2014. Artículo 71 (párrafo primero), Ley de Petróleos Mexicanos. México, D. F. 116 pp.

- Pérez-Armendáriz, B., D. Castañeda-Antonio, G. Castellanos, T. Jiménez-Salgado, A. Tapia-Hernández y D. Martínez-Carrera. 2011. Efecto del antraceno en el crecimiento de maíz y frijol empleando suelos de origen agrícola. *Revista Terra Latinoamericana* 29: 95-102.
- Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied and Environmental Biotechnology* 57: 20–33.
- PROFEPA. 2014. Reporte de Derrames de Petróleo Crudo al Primer Semestre de 2014. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente y Comisión Nacional de Hidrocarburos. 2 pp.
- 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* 2(5): 64-72.
- Rangel, O. S. X. 2012. Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Tesis de Magíster en Ingeniería Química. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-IPN Tlaxcala. 147 pp.
- Rendón-Hernández, G. A. 2015. Caracterización y cultivo de diferentes recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. 158 pp.
- Rodríguez-Vázquez, R. 2012. Biorremediación de suelos con residuos agroindustriales. *Avance y Perspectiva. Nueva Época* 4(3):6.
- Rodríguez-Vázquez, R., T. Cruz-Córdoba, J. M. Fernández-Sánchez, T. Roldán-Carillo, A. Mendoza-Cantú, G. Saucedo-Castañeda y A. Tomasini-Campocoso. 1999. Use of sugarcane bagasse pith as solid substrate for *Phanerochaete chrysosporium* growth. *Folia Microbiology* 44: 213–218.
- Salame, T. M., D. Knop, D. Levinson, O. Yarden y Y. Hadar. 2013. Peroxidases in *Pleurotus ostreatus* redundancy among Manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 79(7): 2405-2415.
- Saval, B. S. 1988. La reparación del daño. Aspectos técnicos: remediación y restauración en la responsabilidad jurídica en el daño ambiental. Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schlosser, D. y C. Höfer. 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn²⁺ in the presence of natural Mn³⁺ chelators as a novel source of extracellular H₂O₂ production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7): 3514-3521.
- SEMARNAT. 2012. Guía para Orientar en la Ejecución de la Comunicación de Riesgos en Sitios Contaminados Prioritarios o de Alto Riesgo. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D. F. 155 pp.
- Sepehri, M., H. Khodaverdilloo y M. Zarei. 2013. Fungi and their Role in Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. Pp. 313-345. *In: Fungi as Bioremediators: An Introduction to Bioremediation*. Eds. E.M. Goltapeh, D. Y. Rezaee y A. Varma. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Singh, D y R. Kumar. 2010 Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemist Biotechnology* 160: 1760-1788.

- Spezzia, T. 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. Tesis de Doctorado en Estrategias para el desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Puebla. 162 pp.
- Surridge, A. K. J., F. C. Wehner y T. E. Cloete. 2009. Bioremediation of Polluted Soil. Pp. 103-121. *In: Advances in Applied Bioremediation, Soil Biology*. Eds. A. Singh, R. C. Kuhad y P. O. Ward. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Téllez, A., Y. Mercado, M. A. Anducho, A. P. Maqueda, J. M. Rivera, M. G. Cruz y A. Arana. 2010. Aislamiento de hongos basidiomicetos y su aplicación a procesos de deslignificación de residuos vegetales y al tratamiento de efluentes de origen textil. Capítulo 6. Pp. 77-89. *In: 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.
- Tien, M y T. Kirk. 1989. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete Chysosporium*. Pp. 238-249-249. *In: Methods in enzymology-Biomass, part b, lignin, pectin and chitin*. Eds. W. A. Wood y S. T. Kellogg. CA: Academic Pres, Inc., San Diego.
- Valderrama, B. y J. Téllez. 2000. Microbiología del petróleo y sus derivados. Instituto de Biotecnología. UNAM. 30 pp.
- Vázquez, L. D. 2011. Consecuencias de la contaminación por hidrocarburos del petróleo sobre la salud humana y fertilidad de suelos en Huimanguillo, Tabasco. Tesis de doctorado en ciencias en Socioeconomía, Estadística e Informática. Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo. 229 pp.
- Velazco, A. N. 2006. Efecto de un campo eléctrico en la degradación de hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte. Tesis de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 105 pp.
- Villanueva, C. E., G. G. Alcántar, G. P. Sánchez, F. M. Soria y S. A. Larqué. 2009. Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura] en Yucatán. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 15: 25-31.
- Volke, T. y J. A. Velazco. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT. México D. F. 64 pp.
- Volke, T. y J. A. Velazco. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Dirección de Investigación en Residuos y Proyectos Regionales. SEMARNAT, CENICA, INECOL. México D. F. 33 pp.
- Vyas, B. R. M. y H. P. Molitoris 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. *Applied Environ Microbiology* 61: 3919-3927.
- Wood, I. P., A. Elliston, P. Ryden, I. Bancroft, I. N. Roberts y K. W. Waldron. 2012. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy* 44: 117-121.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de la actividad de lacasas del testigo 1 versus el tratamiento 1

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	22125.55211	2011.41383	747.63	<.0001
Error	24	64.56961	2.69040		
Total correcto	35	22190.12172			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Lacasa Media	
	0.997090	9.583446	1.640244	17.11539	
Fuente trat	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
	11	22125.55211	2011.41383	747.63	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	2.690401
Valor crítico del rango estudentizado	5.09913
Diferencia significativa mínima	4.8289

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	88.653	3	12
B	42.594	3	10
C	23.814	3	8
C	19.735	3	11
D	11.425	3	9
D	8.833	3	6
E D	6.612	3	7
E F	2.741	3	5
F	0.627	3	4
F	0.370	3	3
F	0.078	3	1
F	-0.096	3	2

Anexo 2. Análisis estadístico de la actividad de MnP del testigo 1 versus el tratamiento 1

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MnP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	1.65441339	0.15040122	256.41	<.0001
Error	24	0.01407783	0.00058658		
Total correcto	35	1.66849122			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	MnP Media	
	0.991563	10.08206	0.024219	0.240222	

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	1.65441339	0.15040122	256.41	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MnP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	0.000587
Valor crítico del rango estudentizado	5.09913
Diferencia significativa mínima	0.0713

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.63133	3	12
B	0.52083	3	10
B	0.46033	3	8
C	0.37517	3	9
C	0.36500	3	11
D	0.16083	3	6
D	0.15200	3	7
D	0.14450	3	3
D	0.11833	3	4
E	0.03317	3	5
F E	-0.03050	3	2
F	-0.04833	3	1

Anexo 3. Análisis estadístico de la actividad de LiP del testigo 1 versus el tratamiento 1

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: LiP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	117.4665786	10.6787799	208.38	<.0001
Error	24	1.2299321	0.0512472		
Total correcto	35	118.6965107			

R-cuadrado	0.989638
Coef Var	12.18145
Raiz MSE	0.226378
LiP Media	1.858386

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	117.4665786	10.6787799	208.38	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para LiP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	0.051247
Valor crítico del rango estudentizado	5.09913
Diferencia significativa mínima	0.6665

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
--------------------	-------	---	------

	A	5.7731	3	12
	B	4.7902	3	11
	C	2.8205	3	10
D	C	2.3154	3	9
D		1.9969	3	8
D		1.9619	3	7
D		1.6511	3	6
	E	0.6379	3	5
	E	0.1406	3	3
	E	0.1080	3	2
	E	0.0699	3	4
	E	0.0350	3	1

Anexo 4. Análisis estadístico de pH del tratamiento 1 versus el tratamiento 2

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: pH

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	3.16147896	0.45163985	109.19	<.0001
Error	16	0.06617800	0.00413613		
Total correcto	23	3.22765696			

	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pH Media
	0.979497	1.193859	0.064313	5.386958

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	7	3.16147896	0.45163985	109.19	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pH

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	0.004136
Valor crítico del rango estudentizado	4.89622
Diferencia significativa mínima	0.1818

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	5.90067	3	2
B	5.73733	3	4
B	5.60167	3	6
C	5.51433	3	8
C	5.51000	3	7
D	4.95733	3	5
D	4.95300	3	3
D	4.92133	3	1

Anexo 5. Análisis estadístico de la actividad de lacasas del tratamiento 1 versus el tratamiento 2

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	472.8089071	52.5343230	52.55	<.0001
Error	20	19.9926202	0.9996310		
Total correcto	29	492.8015274			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Lac Media	
	0.959431	18.91958	0.999815	5.284553	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	9	472.8089071	52.5343230	52.55	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lac
 NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	20
Error de cuadrado medio	0.999631
Valor crítico del rango estudentizado	5.00788
Diferencia significativa mínima	2.8908
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.	
Tukey Agrupamiento	Media N trat
A	12.4867 3 8
A	11.1345 3 7
B	6.5288 3 10
B	5.9739 3 4
B	5.8419 3 9
C B	4.6735 3 6
C B	4.3302 3 3
C D	1.9842 3 5
D	-0.0490 3 1
D	-0.0590 3 2

Anexo 6. Análisis estadístico de la actividad de MnP del tratamiento 1 versus el tratamiento 2

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MnP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	0.54503297	0.06055922	27.00	<.0001
Error	20	0.04485733	0.00224287		
Total correcto	29	0.58989030			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	MnP Media	
	0.923956	28.47800	0.047359	0.166300	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	9	0.54503297	0.06055922	27.00	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MnP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 20
 Error de cuadrado medio 0.002243
 Valor crítico del rango estudentizado 5.00788
 Diferencia significativa mínima 0.1369

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.38800	3	8
A	0.33433	3	10
A	0.31767	3	7
A	0.26200	3	9
B	0.09233	3	6
B	0.08500	3	3
B	0.07133	3	5
B	0.06700	3	4
B	0.02300	3	2
B	0.02233	3	1

Anexo 7. Análisis estadístico de la actividad de LiP del tratamiento 1 versus el tratamiento 2

Variable dependiente: LiP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	29.96332613	3.32925846	369.49	<.0001
Error	20	0.18020933	0.00901047		
Total correcto	29	30.14353547			
R-cuadrado	0.994022	Coef Var	10.98821	Raiz MSE	0.094923
				LiP Media	0.863867

Fuente trat	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	9	29.96332613	3.32925846	369.49	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para LiP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 20
 Error de cuadrado medio 0.00901
 Valor crítico del rango estudentizado 5.00788
 Diferencia significativa mínima 0.2745

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	2.58167	3	8
A	2.58033	3	7
B	1.75100	3	9
C	0.91400	3	10
D	0.36800	3	6
E	0.24400	3	3
E	0.10667	3	4
E	0.10433	3	5
E	0.06000	3	2
F	-0.07133	3	1

Anexo 8. Análisis estadístico del pH de *P. levis* (CP-30) en los medios de cultivo EMA y PDA adicionado con AAS 1 µM y 100 µM usando inóculo convencional y homogeneizado

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: pH

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	20.96631594	1.23331270	280.58	<.0001
Error	54	0.23736200	0.00439559		
Total correcto	71	21.20367794			
R-cuadrado		Coef Var	Raiz MSE	pH Media	
	0.988806	1.167966	0.066299	5.676472	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	17	20.96631594	1.23331270	280.58	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pH

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	54
Error de cuadrado medio	0.004396
Valor crítico del rango estudentizado	5.17906
Diferencia significativa mínima	0.1717

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	6.25000	4	1
A	6.24250	4	3
A	6.23000	4	2
A	6.21750	4	5
B A	6.15500	4	6
B A	6.15250	4	4
B C	5.99000	4	13
C	5.98000	4	15
D C	5.83000	4	14
D	5.79125	4	9
D	5.78175	4	8
D	5.77300	4	7
E	5.19975	4	16
E	5.15625	4	17
E	5.12200	4	18
F	4.82750	4	10
F	4.79000	4	11

Anexo 9. Análisis estadístico de la actividad de lacasas de *P. levis* (CP-30) en los medios de cultivo EMA y PDA adicionado con AAS 1 µM y 100 µM usando inóculo convencional y homogeneizado

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	11558.73956	679.92586	93.44	<.0001
Error	36	261.95287	7.27647		
Total correcto	53	11820.69243			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pH Media
0.977839	19.88118	2.697493	13.56807

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	17	11558.73956	679.92586	93.44	<.0001

Procedimiento ANOVA
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	36
Error de cuadrado medio	7.276468
Valor critico del rango estudentizado	5.30381
Diferencia significativa mínima	8.2601

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	49.802	3	12
B	35.699	3	9
C B	28.756	3	11
C D	26.690	3	10
C D	25.903	3	7
C D	23.213	3	8
D	19.618	3	15
E	10.893	3	14
E	9.539	3	13
F E	5.037	3	17
F E	5.022	3	16
F E	4.196	3	18
F	0.115	3	2
F	0.049	3	1
F	0.040	3	3
F	-0.046	3	4
F	-0.146	3	6

Anexo 10. Análisis estadístico del pH de *P. levis* (CP-30) del tratamiento 7 y 10

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: pH

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	0.07040196	0.01005742	6.90	0.0007
Error	16	0.02332400	0.00145775		
Total correcto	23	0.09372596			

	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pH Media		
	0.751147	0.645864	0.038180	5.911542		
				Cuadrado de		
Fuente	DF	Anova SS	la media	F-Valor	Pr > F	
trat	7	0.07040196	0.01005742	6.90	0.0007	
Sistema SAS	21:40 Monday, March 15, 2015 40					

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pH

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa				0.05
Error de grados de libertad				16
Error de cuadrado medio				0.001458
Valor crítico del rango estudentizado				4.89622
Diferencia significativa mínima				0.1079
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	trat	
A	5.98233	3	3	
B A	5.97200	3	5	
B A	5.94300	3	7	
B A	5.91367	3	6	
B A C	5.90867	3	4	
B A C	5.90067	3	2	
B C	5.86967	3	8	
C	5.80233	3	1	

Anexo 11. Análisis estadístico de la actividad enzimática de lacasas de *P. levis* (CP-30) del tratamiento 7 y 10

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	7396.245012	821.805001	19.54	<.0001
Error	20	841.154399	42.057720		
Total correcto	29	8237.399411			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Lac Media	
	0.897886	29.16843	6.485192	22.23360	
Fuente	DF	Anova SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	9	7396.245012	821.805001	19.54	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa				0.05
Error de grados de libertad				20
Error de cuadrado medio				42.05772
Valor crítico del rango estudentizado				5.00788
Diferencia significativa mínima				18.751
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	42.005	3	8
A	40.755	3	5
B A	38.330	3	6
B A	35.423	3	10
B A C	25.105	3	4
B C	19.907	3	3
D C	13.634	3	7
D C	6.843	3	9
D	0.195	3	1
D	0.138	3	2

Anexo 12. Análisis estadístico de la actividad enzimática de MnP de *P. levis* (CP-30) del tratamiento 7 y 10

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MnP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	0.16163937	0.01795993	26.05	<.0001
Error	20	0.01378733	0.00068937		
Total correcto	29	0.17542670			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Lac Media
0.921407	24.74627	0.026256	0.106100

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	9	0.16163937	0.01795993	26.05	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MnP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	20
Error de cuadrado medio	0.000689
Valor crítico del rango estudentizado	5.00788
Diferencia significativa mínima	0.0759

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.21567	3	4
B A	0.20500	3	3
B A C	0.17600	3	10
B D C	0.13267	3	9
E D C	0.10600	3	7
E D C	0.10067	3	6
E D F	0.07133	3	8
E F	0.05367	3	5
F	0.00000	3	1
F	0.00000	3	2

Anexo 13. Análisis estadístico de la actividad enzimática de lacasas de *P. levis* (CP-30) del tratamiento 7 y 11.

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	18714.89666	2673.55667	14.56	<.0001
Error	16	2938.83107	183.67694		
Total correcto	23	21653.72774			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Lac Media	
	0.864281	25.96472	13.55275	52.19678	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	7	18714.89666	2673.55667	14.56	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	183.6769
Valor crítico del rango estudentizado	4.89622
Diferencia significativa mínima	38.311
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.	
Tukey Agrupamiento	Media N trat
A	88.01 3 5
A	86.57 3 2
B A	75.03 3 6
B A C	50.09 3 8
B C	42.55 3 4
B C	40.03 3 7
D C	35.25 3 3
D	0.04 3 1

Anexo 14. Análisis estadístico de la actividad enzimática de MnP de *P. levis* (CP-30) del tratamiento 7 y 11.

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MnP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	0.92896333	0.13270905	91.73	<.0001
Error	16	0.02314900	0.00144681		
Total correcto	23	0.95211233			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Lac Media	
	0.975687	15.61560	0.038037	0.243583	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	7	0.92896333	0.13270905	91.73	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MnP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	0.001447
Valor crítico del rango estudentizado	4.89622
Diferencia significativa mínima	0.1075

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	trat
	A	0.56367	3	6
	A	0.55900	3	5
	B	0.25500	3	3
C	B	0.19867	3	2
C	B D	0.15033	3	8
C	D	0.14550	3	4
	E D	0.07650	3	7
	E	0.00000	3	1