



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Degradación de endosulfán en aguas contaminadas mediante  
procesos enzimáticos promovidos por co-cultivos fúngicos en un  
reactor tipo Airlift.**

Tesis que presenta:

**Anlui Rodríguez Carreón**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de tesis: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

## *Agradecimientos*

*Quisiera aprovechar estas líneas para expresar el más profundo agradecimiento a mi familia por su gran amor y apoyo incondicional. Dedico este trabajo con mucho cariño a mis padres Margarita Carreón, Cándido Rodríguez, Lucio Santos y a mi hermano Alan, sin el apoyo de todos ustedes no estaría hoy donde estoy. Dedico también de manera muy especial este logro a mis "tatas", quienes siempre han sabido guiarme y aconsejarme, ayudándome a dar lo mejor de mí y ser una mejor persona. Agradezco de igual forma a mis tíos Adonái, Dalía y Magnolia quienes siempre han estado ahí brindándome su valioso apoyo.*

*Deseo agradecer a la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por sus enseñanzas, consejos y regaños tanto académicos como personales; especialmente por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente dentro de su grupo de trabajo, por brindarme su guía y su confianza.*

*A los investigadores Dr. Enrique Alarcón del Instituto de Biotecnología Aplicada de la Universidad Veracruzana y Dr. Ricardo Aguilar del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav por todas las aportaciones y sugerencias que me hicieron durante la elaboración de este trabajo, las cuales contribuyeron a enriquecer la calidad del mismo. A la Dra. Emma Gloria Ramos y a Vania Muñoz quienes a través de la coordinación académica estuvieron al pendiente de mí y me brindaron su apoyo con mucha amabilidad y paciencia.*

*A todos mis compañeros, estudiantes de estancia y miembros del laboratorio 44 cuya solidaridad, consejo y compañía fueron vitales en esta etapa de mi vida. A la Dra. Martha Barajas y Dolores Díaz por sus pláticas enriquecedoras. A los amigos que me acompañaron día a día, dentro y fuera del laboratorio: Roberto Zúñiga, Fernanda Romo, Wilberth Chan, Alejandro Islas, Ernesto García, Martín Herrera, Isaac Montes, Víctor González y Adilene Mandujano, gracias por tantos buenos momentos.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría y al Cinvestav porque me ha ofrecido una preparación profesional de primer nivel así como la oportunidad de obtener un importante crecimiento personal.*

*No alcanzan las palabras para mencionar a todas y cada una de las personas que me acompañaron y me apoyaron durante esta etapa, la cual sin duda ha sido una de las más importantes de mi vida, sin embargo, quiero que sepan que de todo corazón siempre estaré agradecido. No hace falta la mención; ustedes saben quiénes son.*

## RESUMEN

El endosulfán es un compuesto organoclorado persistente y altamente tóxico que está presente en una gran variedad de plaguicidas comerciales. La biorremediación representa una opción prometedora para mitigar la problemática causada por este contaminante debido a que es una técnica amigable con el ambiente y de bajo costo en comparación con sistemas físico-químicos. Sin embargo, es necesario realizar una correcta selección de los organismos remediadores debido a que el sulfato de endosulfán (metabolito final producido por la gran mayoría de los microorganismos silvestres) presenta características de toxicidad y persistencia similares al compuesto parental. En el presente proyecto se estudió la remoción de endosulfán en agua contaminada dentro de un reactor tipo airlift (ALB) de 2L bajo condiciones por lote durante 12 días y utilizando el co-cultivo *Trametes sp./Paecilomyces formosus* soportado en cáscara de naranja como agente biorremediador. Los hongos utilizados fueron seleccionados en base a su tolerancia y habilidad para transformar endosulfán con poca o nula acumulación de sulfato de endosulfán. La selección del sustrato óptimo se realizó mediante fermentaciones en sustrato sólido utilizando 5 residuos agro-industriales y evaluando la producción de MnP y lacasa así como la velocidad de crecimiento de capa cepa. Se propuso un diseño experimental del tipo compuesto central para maximizar la producción enzimática en el co-cultivo *Trametes sp./P. formosus*, los factores evaluados fueron: Tiempo de fermentación, tiempo de inoculación del micromiceto y el porcentaje de humedad del sustrato. Se identificaron 9 cepas con alta tolerancia al endosulfán y 4 con alto potencial para transformarlo en medio líquido acumulando poco o nulo sulfato de endosulfán. La cáscara de naranja fue el sustrato que presentó mejores características para el crecimiento de los hongos pre-seleccionados encontrándose rendimientos máximos de  $92 \pm 15$  U lacasa/g sustrato en el hongo *Trametes sp.* a los 7 días de fermentación. Los resultados obtenidos a través del CCD para la optimización de la producción de lacasa mostraron un rendimiento máximo experimental de 219.4 U/g sustrato y un rendimiento teórico máximo de 235.8 U/g sustrato. Las pruebas de degradación en el ALB exhibieron una eficiencia de remoción del 95% del endosulfán total. Se detectó una concentración final de 0.43 ppm de sulfato de endosulfán lo que representa el 8.36% del endosulfán inicial, de este modo la eficiencia real de remediación en el sistema fue de 86.64%.

## ABSTRACT

Endosulfan is a persistent and highly toxic organochlorine compound which can be found in a large variety of commercial pesticides. Bioremediation represents a promising option to mitigate the negative impacts of this compound in soil and water because it is an eco-friendly technique that can be applied with a relative low cost compared to physical-chemical treatments. However, a correct selection of the organisms involved in the bioremediation process becomes necessary due to the production of endosulfan sulphate, the end-metabolite produced by most wild microorganisms which is equally toxic and persistent than the parental compound.

In the present work, we studied endosulfan removal from contaminated water inside a 2L airlift bioreactor (ALB) operating under batch mode for 12 days using a fungal co-culture (*P. formosus* and *Trametes* sp.) supported in orange peel as bioremediation agent. Fungi used in the ALB tests were selected based on their tolerance and ability to transform endosulfan with low or none production of endosulfan sulfate. Orange peel was chosen over 4 other agro-industrial wastes because of its higher activity of laccase and Manganese peroxidase and the faster growing velocity when fungi were cultivated under solid substrate conditions (SSF). A central composite experimental design (CCD) was proposed to maximize enzymatic production of the *Trametes* sp./*P. formosus* co-culture in orange peel, the evaluated factors were: Fermentation time, inoculation time of micromycete and humidity of substrate.

9 high tolerant strains were detected, 4 of them were identified as high potential endosulfan degrading agents because of their low or non-existent endosulfan sulfate accumulation. Orange peel exhibited the best characteristics between all analyzed substrates showing a laccase yield of  $92 \pm 15$  U/g substrate at day 7 when using *Trametes* sp. CCD results showed an experimental maximum laccase yield equals to 219.4 U/g and a theoretical maximum yield of 235.8 U/g. Endosulfan removal in the ALB system revealed an efficiency of 95% for total endosulfan. A final concentration of 0.43 ppm of endosulfan sulphate was detected, this concentration represents 8.36% of initial endosulfan, thereby; the real endosulfan remediation efficiency in the system was 86.64%.

## INDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Plaguicidas organoclorados.....	10
1.2 Endosulfán.....	13
1.2.1 Endosulfán y su persistencia en el ambiente.....	15
1.2.2 Toxicidad y límites máximos permisibles de endosulfán. ....	16
1.2.3 Legislación y panorama mundial.....	17
1.3 Mecanismos enzimáticos en la degradación de plaguicidas por hongos de pudrición blanca.....	17
1.3.1 Manganese peroxidases (MnP).....	19
1.3.2 Lacasas.....	20
1.4 Degradación de Endosulfán.....	20
1.4.1 Degradación por basidiomicetos.....	21
1.4.2 Degradación por micromicetos.....	22
1.4.3 Co-cultivos.....	23
1.5 Biorreactores en la producción de enzimas.....	26
1.6 Reactores tipo airlift.....	27
2. JUSTIFICACIÓN .....	29
3. HIPÓTESIS .....	30
4. OBJETIVO GENERAL.....	31
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
5.1 Ensayos toxicológicos.....	32
5.1.1 Condiciones y método de siembra.....	32
5.2 Obtención de extractos enzimáticos.....	34
5.3 Preparación de soluciones de esporas.....	34
5.4 Actividad de Lacasa.....	35
5.5 Actividad de Manganese Peroxidasa.....	35
5.6 Proteína Extracelular .....	36
5.7 Análisis estadísticos.....	37
5.8 Pruebas de degradación en cultivo líquido por lote.....	37
5.9 Evaluación de co-cultivos, ensayo de compatibilidad.....	39
5.10 Fermentación en sustrato sólido (SSF) de co-cultivos: Selección de tipo de sustrato y tiempo de fermentación.....	40
5.11 Evaluación in vitro de la producción de lacasa del co-cultivo <i>Trametes sp./ P. formosus</i> : Influencia del tiempo y la etapa de crecimiento.....	41
5.12 Efecto del tamaño de inóculo en el crecimiento vegetativo de <i>P. formosus</i> .....	42
5.13 Optimización de producción enzimática a través de un diseño de compuesto central (CCD).....	43
5.14 Degradación de endosulfán en ALB .....	44
6 RESULTADOS.....	48
6.1 Ensayos toxicológicos basidiomicetos.....	48
6.1.2 Ensayos toxicológicos micromicetos.....	52
6.2 Pruebas de degradación en cultivo líquido por lote .....	54
6.2.1 Actividad enzimática en pruebas de degradación en medio líquido .....	57
6.3 Ensayo de compatibilidad de co-cultivos.....	59
6.4. Actividad enzimática en ensayos de compatibilidad en co-cultivos.....	61
6.5 SSF de co-cultivos: Selección de tipo de sustrato y tiempo de fermentación .....	63
6.6 Influencia del tamaño de inóculo en el crecimiento vegetativo de <i>P. formosus</i> .....	67
6.7 Optimización de producción enzimática a través de un diseño de compuesto central (CCD).....	70
6.7.1 Optimización de la actividad de Lacasa.....	71
6.7.2 Optimización de la producción de MnP .....	77
6.8 Remoción de endosulfán en un ALB .....	84
7. CONCLUSIONES .....	86
8 RECOMENDACIONES .....	88
9 ANEXOS .....	90
10. BIBLIOGRAFÍA .....	93

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Isómeros del plaguicida endosulfán. (a) $\alpha$ -endosulfán. (b) $\beta$ -endosulfán.....	14
Figura 2. Rutas teorizadas en la degradación biológica de endosulfán. ....	22
Figura 3. Representación tridimensional ALB.....	46
Figura 4. Crecimiento relativo. ....	48
Figura 5. Tasa media de crecimiento (mm/día). ....	49
Figura 6. Perfiles de actividad de lacasa a diferentes concentraciones de endosulfán. ....	51
Figura 7. Perfiles de actividad de MnP a diferentes concentraciones de endosulfán. ....	52
Figura 8. Tasas medias de crecimiento de los micromicetos. ID1= <i>P. formosus</i> .....	53
Figura 9. Porcentajes de recuperación de $\alpha$ y $\beta$ endosulfán y sulfato de endosulfán..	54
Figura 10. Cromatogramas estándares. ....	56
Figura 11. Cromatograma tratamiento <i>P. formosus</i> .....	56
Figura 12. Cromatograma tratamiento <i>Pleurotus sp.</i> .....	57
Figura 13. Actividad de lacasa en pruebas de degradación en medio líquido por lote .....	57
Figura 14. Actividad de MnP pruebas de degradación en medio líquido por lote .....	58
Figura 15. A) <i>Trametes sp.</i> B) Co-cultivo <i>Trametes sp.</i> / <i>A. tamaritii</i> C) Co-cultivo <i>Trametes sp.</i> / <i>P. formosus</i> .....	59
Figura 16. Columnas: A) <i>T. maxima</i> B) Co-cultivo <i>T. maxima</i> / <i>P. formosus</i> C) Co-cultivo <i>T. maxima</i> / <i>A. tamaritii</i> .....	59
Figura 17. Columnas: A) <i>P. sanguineus</i> B) Co-cultivo <i>P. sanguineus</i> / <i>A. tamaritii</i> C) Co-cultivo <i>P. sanguineus</i> / <i>P. formosus</i> .....	60
Figura 18. Actividad de lacasa en SSF de <i>Trametes sp.</i> y <i>Pleurotus sp.</i> con diferentes sustratos. ....	63
Figura 19. Actividad de lacasa en cáscara de naranja como sustrato.....	64
Figura 20. Actividad de MnP en cáscara de naranja como sustrato.....	65
Figura 21. Actividad de lacasa con cáscara de mandarina como sustrato.....	66
Figura 22. Actividad de MnP en cáscara de mandarina como sustrato.....	67
Figura 23. Crecimiento de <i>P. formosus</i> .....	68
Figura 24. Imagen del día 5 de incubación de <i>P. formosus</i> .....	69
Figura 25. Gráfica de Pareto estandarizada para Lacasa. ....	72
Figura 26. Gráfico de efectos principales para Lacasa.....	72
Figura 27. Análisis de residuales. Valor predicho vs. Valor residual. ....	74
Figura 28. Análisis de residuales. Valor predicho vs Valor real.....	74
Figura 29. Gráfico de probabilidad normal para lacasa .....	75
Figura 30. Superficie-respuesta de Lacasa para la interacción TF vs Humedad. TI= 0 (2 días). ....	76
Figura 31. Gráfico de Pareto estandarizado para MnP. ....	78
Figura 32. Gráfico de efectos principales para MnP .....	78
Figura 33. Gráfico de interacción para MnP. A= Humedad, B= Tiempo de fermentación, C= Tiempo de inoculación de <i>P. formosus</i> . ....	79
Figura 34. Gráfico de probabilidad normal para MnP .....	80
Figura 35. Análisis de residuales. Valor predicho vs valor real .....	81
Figura 36. Análisis de residuales. Valores Residuales vs. Valores Predichos .....	81
Figura 37. Gráfico superficie-respuesta para MnP. C: TI= 0 (2 días) .....	82
Figura 38. Degradación de endosulfán y producción de sulfato de endosulfán en el ALB .....	84
Figura 39. Actividad de lacasa y disminución del pH en ALB.....	85
Figura 40. Curva de calibración proteína extracelular método Bradford.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su familia química. ....	10
Tabla 2. Categorización de químicos orgánicos en términos de su transportación a largo alcance .....	12
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los isómeros de endosulfán y sulfato de endosulfán. ....	15
Tabla 4. Capacidad de degradación de plaguicidas por hongos de pudrición blanca.....	19
Tabla 5. Estudios realizados sobre la inducción de la actividad de lacasa en Co-cultivos .....	26
Tabla 6. Organismos estudiados en los bioensayos dosis respuesta. ....	32
Tabla 7. Composición medio libre de azufre. ....	33
Tabla 8. Composición solución traza medio libre de azufre .....	33
Tabla 9. Composición de solución Bradford .....	37
Tabla 10. Composición del medio con nitrógeno limitado .....	38
Tabla 11. Componentes solución traza medio nitrógeno limitado .....	38
Tabla 12. Codificación según tipo de interacción.....	40
Tabla 13. Composición medio Dwivedi durante SSF .....	41
Tabla 14. Concentración de esporas en solución y número de esporas contenidas en 5 uL de inóculo ..	43
Tabla 15. Valores naturales y codificados del diseño de compuesto central .....	44
Tabla 16. Matriz de diseño con valores codificados. ....	44
Tabla 17. Parámetros de diseño y características hidrodinámicas ALB .....	46
Tabla 18. Composición medio Dwidevi durante pruebas de degradación en ALB.....	47
Tabla 19. Resultados análisis Probit basidiomicetos. ....	50
Tabla 20. Resultados análisis Probit en micromicetos .....	52
Tabla 21. Remoción de endosulfán en pruebas de degradación .....	55
Tabla 22. Interacciones entre basidiomicetos y micromicetos cultivados en PDA .....	60
Tabla 23. Producción de lacasa en co-cultivos de Basidiomicetos/ Micromicetos .....	61
Tabla 24. Actividad de MnP en ensayos de compatibilidad de co-cultivos. ....	62
Tabla 25. Tasa media de crecimiento y densidad de esporas de <i>P. formosus</i> .....	68
Tabla 26. Matriz experimental del CCD en valores naturales y respuestas obtenidas .....	70
Tabla 27. Anova para la respuesta Lacasa.....	71
Tabla 28. Resultados del análisis de regresión para Lacasa .....	73
Tabla 29. Valores naturales óptimos para la maximización de la actividad de lacasa. ....	76
Tabla 30. ANOVA para MnP. ....	77
Tabla 31. Valores del Análisis de Regresión para MnP.....	79
Tabla 32. Valores óptimos codificados para maximizar la actividad de MnP .....	82

## **ABREVIATURAS**

**ALB:** Biorreactor tipo Airlift (*Airlift Bioreactor*)

**APD:** Agar papa-dextrosa.

**CCD:** Diseño experimental de compuesto central (*Central composite design*).

**CE<sub>50</sub>:** Concentración efectiva media.

**COP:** Compuesto orgánico persistente.

**H:** Constante de Henry.

**IA:** Índice de antagonismo.

**K<sub>oa</sub>:** Coeficiente de partición octanol-aire.

**K<sub>oc</sub>:** Coeficiente de adsorción de carbono orgánico.

**K<sub>ow</sub>:** Coeficiente de partición octanol-agua.

**MnP:** Manganese peroxidasa.

**PI:** Potencial de Ionización.

**SDL:** Sistema de degradación de lignina.



## 1 INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas prioritarios a nivel mundial es el del acceso a los alimentos. Por ello, la agricultura es un componente dominante de la economía mundial. La necesidad acuciante de producir alimentos en cantidad suficiente ha repercutido en las prácticas agrícolas de todo el mundo (Ongley 1997). En muchos países, esta presión ha originado una expansión hacia tierras marginales y normalmente está asociada a la agricultura de subsistencia. En otros, la necesidad de alimentos ha llevado a la expansión del riego y a una utilización cada vez mayor de fertilizantes y plaguicidas con el fin de lograr y mantener rendimientos altos.

La agricultura es la principal actividad consumidora de agua dulce, ya que utiliza alrededor del 70% de todos los suministros hídricos superficiales (Ongley 1997). No obstante, la agricultura es al mismo tiempo causa y víctima de la contaminación de los recursos hídricos. Es causa, por la descarga de contaminantes y sedimentos en las aguas superficiales y/o subterráneas, por la pérdida neta de suelo como resultado de prácticas agrícolas desacertadas y por la salinización y anegamiento de las tierras de regadío. Es víctima, por el uso de aguas residuales y aguas superficiales y subterráneas contaminadas, que contaminan a su vez los cultivos y transmiten enfermedades a los consumidores y trabajadores agrícolas.

La contaminación del agua ocurre durante los ciclos de evaporación, transpiración, transporte de vapor y los flujos de agua subterránea. El agua superficial se contamina por residuos orgánicos y por residuos de procesos industriales, incorporando estos contaminantes a lagos o cuerpos de agua por descargas puntuales o por fuentes difusas, o como en el caso de plaguicidas y fertilizantes, en escorrentías de agua de lluvia. Los contaminantes alcanzan el agua subterránea

a través del suelo, al ser transportados por advección y difusión molecular (Rajeshwar & Ibañez, 1997).

### 1.1 Plaguicidas organoclorados.

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como lo son; la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso. De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su familia química.

<b>Estructura química</b>	<b>Ejemplos</b>
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín.
Organofosforados	Bromofos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbarilo, metomilo, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretoides	Cypermctrina, fenvalerato, permetrina
Derivados bipirilidos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloropropeno, picloram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, ametrina, desmetrina, simazina
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatina, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxico, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001

Los plaguicidas organoclorados pueden subdividirse en tres grupos, que son representados por el DDT, los hexaclorohexanos (HCH) y el aldrín (ciclodienos). A pesar de las diferencias estructurales, los tres grupos son químicamente estables, tienen baja solubilidad en agua, solubilidad moderada en disolvente orgánicos y en lípidos, y baja presión de vapor. Las propiedades de estabilidad y solubilidad los hacen muy persistentes en el ambiente, produciendo los mismos efectos fisiológicos en los insectos. Así mismo, estos son

los compuestos que más se han analizado respecto al transporte a largo alcance; donde los mayores niveles de concentración se han detectado en ríos y lagos en países desarrollados (Hill, 2008). Una prueba importante de la persistencia de estos compuestos en el ambiente es su acumulación en organismos como son; plantas, animales terrestres y acuáticos. Pudiendo llegar a acumularse en los humanos a través de la ingesta de productos contaminados (Vassilev & Kambourova, 2006).

Una propiedad común de las sustancias orgánicas recalcitrantes es su persistencia en el ambiente, sin embargo esta característica no es la determinante para el transporte a largo rango a través de la atmósfera y la hidrósfera. Estos compuestos son no polares lo que no los hace compatibles con el agua y tienen una volatilidad intermedia. Por lo que son sustancias que no estarán exclusivamente en el agua o en el aire, es por esto que se les denomina contaminantes intermedios. El transporte a largo alcance de las sustancias persistentes puede realizarse de diversas formas, una de ellas es como vapor en una nube o adsorbido en partículas suspendidas en la atmósfera, otra es que están disueltas en el agua o adsorbidas en partículas en ríos, lagos u océanos, o pueden concentrarse en tejidos en aves migratorias y otros animales. La fracción por la que las sustancias sean transportadas por una forma y otra depende de las propiedades fisicoquímicas específicas de los compuestos. De acuerdo a su volatilidad y solubilidad en agua, las sustancias pueden ser divididas en cuatro principales grupos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Categorización de químicos orgánicos en términos de su transportación a largo alcance

<b>Categoría</b>	<b>Características</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>A. Sin salto</b>	Tan volátiles que no se depositan en la superficie de la tierra, sino que permanecen en la atmósfera.	Clorofluorocarburos
<b>B. Multi-salto</b>	Cambian su distribución entre la fase acuosa y la condensada (Suelo, vegetación, agua) en respuesta a los cambios en la temperatura ambiente y la composición de fase, pueden viajar largas distancias en ciclos de evaporación y deposición.	Hexaclorobenzeno. Toxafeno Dieldrín Endosulfán BPC's ligeros PCDD/PCDF ligeros
<b>C. Salto único</b>	No son volátiles y son insolubles en agua por lo que pueden transportarse en sólidos suspendidos en aire y agua.	Mirex Benzo-a-pireno PCDD/PCDF pesados
<b>D. Salto no requerido</b>	Suficientemente solubles en agua para ser transportados en la fase acuosa.	HCHs PCP Atrazina

Fuente: Vassilev & Kambourova, 2006 . BPC: Bifenilo poli-clorado. PCP: Fenciclidina. PCDD: Policlorodibenzodioxinas. PCDF: Policlorodibezofuranos

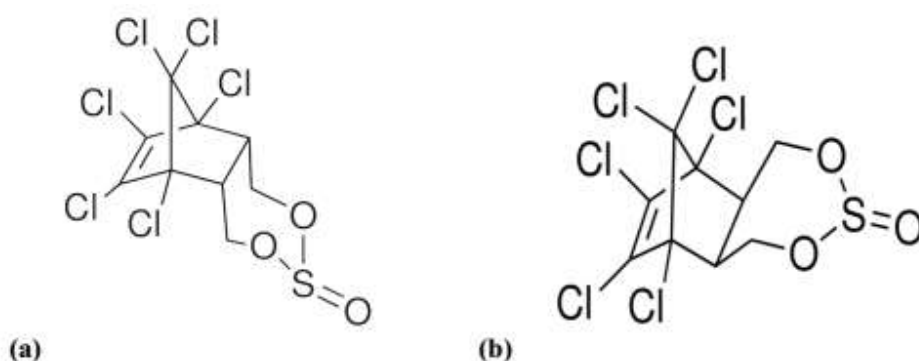
Una medida de la afinidad de las sustancias hacia cierta fase, ya sea aire o agua, se emplean los coeficientes de partición octanol/aire ( $\log K_{oa}$ ) y aire/agua ( $\log K_{aw}$ ). El octanol es empleado como el equivalente a la materia orgánica en el ambiente. Las sustancias con valores de  $K_{oa}$  bajos son volátiles por lo que tienen afinidad a la fase aire; y de manera contraria, sustancias con altos coeficientes tienen baja volatilidad por lo que no tienden a pasar a la fase aire. Sustancias con coeficientes bajos de  $K_{aw}$  tienen mayor solubilidad en agua y son más afines a la fase acuosa, aquellos con valores altos en este coeficiente tienen baja solubilidad en agua. Las sustancias con bajos valores de  $K_{oa}$  y altos valores de  $K_{aw}$  pertenecen a la categoría A (Sin salto); las sustancias con bajos valores de  $K_{aw}$  y  $K_{oa}$  pertenecen a la categoría D (No requieren salto) y serán transportadas a largo alcance en la superficie del suelo y en aguas subterráneas. Las sustancias con baja volatilidad, es decir altos valores del coeficiente  $K_{oa}$ , y baja

solubilidad en agua (alto coeficiente  $K_{aw}$ ) pertenecen al grupo C (salto único) y pueden contaminar áreas pequeñas alrededor de la fuente de contaminación. Las sustancias con volatilidad y solubilidad en agua moderadas pertenecen a la categoría B (multi-salto) y dependiendo de la temperatura del ambiente se moverán de la fase gaseosa hacia el estado condensado. Ningún COP de la Convención de Estocolmo es lo suficientemente volátil para ser considerado en el grupo A, y ningún límite entre categorías está definido y depende de las condiciones externas (Vassilev & Kambourova, 2006). Debido a las diferencias en temperaturas en el ambiente y al movimiento de las masas de aire, el transporte de contaminantes ocurre de regiones cálidas a más frías, de bajas a altas latitudes y altitudes.

## **1.2 Endosulfán.**

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido) es un insecticida que pertenece al grupo de los ciclodienos y es químicamente similar al aldrín, al clordano y al heptacloro.

El endosulfán grado técnico es una mezcla de dos isómeros: alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), en una proporción de 2:1 a 7:3, junto con impurezas y productos degradados, es un sólido cristalino en forma de escamas de color crema a marrón. Es sensible a los ácidos, a los álcalis, poco soluble en agua, fotoestable y no inflamable. Se comercializa como un concentrado emulsionable y debe contener al menos un 94% de endosulfán de acuerdo con las especificaciones de la FAO. El principal metabolito, el sulfato de endosulfán, puede encontrarse en el ambiente por fotólisis del endosulfán o como resultado de la oxidación de éste por microorganismos. Otros productos de degradación incluyen; endosulfán diol, endosulfán lactona, endosulfán éter, endosulfán hidroxieteter, endosulfán ácido carboxílico (Ize-Lema, 2011).



**Figura 1.** Isómeros del plaguicida endosulfán. (a)  $\alpha$ -endosulfan. (b)  $\beta$ -endosulfan. [SigmaAldrich CAS Number 959-98-8 y CAS Number 33213-65-9, respectivamente]

En la Tabla 3 se muestran las propiedades fisicoquímicas más importantes para los dos isómeros de endosulfán y el metabolito primario, sulfato de endosulfán. Ambos isómeros son semi-volátiles y tienen una presión de vapor similar a otros plaguicidas organoclorados, y es similar entre los isómeros mientras que el sulfato es cuatro veces menor. El  $\beta$ -endosulfán tiene una solubilidad en agua considerablemente mayor al isómero  $\alpha$ , por lo que el  $\beta$ -endosulfán tiene constantes de Henry (H) menores, de la misma manera un bajo valor de H se observa para el sulfato endosulfán.

Uno de los criterios para designar a un químico como Compuesto Orgánico Persistente (COP) es un valor  $\log K_{ow} > 5$  (Coeficiente partición octanol/agua), los valores de los isómeros se encuentran ligeramente por debajo (Tabla 3), lo que sugiere un potencial de bioacumulación (Weber, *et al.*, 2010).

**Tabla 3.** Características fisicoquímicas de los isómeros de endosulfán y su metabolito primario: sulfato de endosulfán.

	$\alpha$ - endosulfán	$\beta$ - endosulfán	Sulfato endosulfán
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	406.9	406.9	422.9
P <sub>L</sub> (Pa)	0.004	0.004	0.001
H (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	0.070	0.045	0.015
Log K <sub>ow</sub>	4.94	4.78	3.64
Log K <sub>OA</sub>	8.49	9.53	-

Fuente: Walse, et al., 2002

### 1.2.1 Endosulfán y su persistencia en el ambiente.

Se estima que en suelo y sedimentos, la suma total de endosulfán (isómeros  $\alpha$  +  $\beta$  + sulfato de endosulfán) puede tener una tasa de desintegración media que puede ir desde 9 meses, hasta 6 años. En un gran número de países se han encontrado residuos de endosulfán en todos los ambientes: aire, lluvia, nieve, neblina, lagos, ríos, sedimentos de río, agua subterránea, agua de pozo, agua de manantial, abastos de agua municipal, agua y sedimentos marinos, lagunas, estanques de camarón, estuarios, suelo, corteza de árboles, plantas acuáticas, peces así como en huevos de ave y de cocodrilo (Bejarano, et al. 2009).

El endosulfán no desciende mucho hacia el agua subterránea, pero se ha comprobado que se escurre luego de las fumigaciones (Antonious & Byers, 1997). Ha sido detectado en aguas subterráneas en estratos profundos del terreno, en concentraciones que van desde 0,008 a 0,053 microgramos por litro, hasta 20 días después de la última fumigación (Thanal, 2008). El endosulfán cumple con los criterios especificados en el Anexo D del Convenio de Estocolmo para ser considerado COP pues la vida media en agua es de 1 a 6 meses en condiciones anaeróbicas, en microcosmos agua/sedimento de más de 2 meses, en suelo en condiciones aerobias de 44.5 meses a más de 6 años; por su bioacumulación, con un valor log K<sub>ow</sub> ligeramente menor a 5 (4.65 para  $\alpha$ -endosulfán y de 4.34 para  $\beta$ -

endosulfán). De acuerdo al convenio de Estocolmo, el endosulfán posee un factor de bioacumulación de 3000 (tiene mayor potencial de bioacumulación en especies terrestres que en acuáticas) y presenta transporte en el ambiente a largo rango, pues se han encontrado residuos de endosulfán en biota y ambiente en lugares distantes respecto a donde fue aplicado como el Ártico y Antártida, Himalaya, el Caribe (Ize-Lema 2011).

### **1.2.2 Toxicidad y límites máximos permisibles de endosulfán.**

La EPA ha establecido límites máximos permisibles para el endosulfán en agua y alimentos de acuerdo a criterios de protección de la salud humana. En cuerpos de agua el límite máximo de los dos isómeros de endosulfán y el principal metabolito, sulfato endosulfán es de  $110\mu\text{g L}^{-1}$ ; para la protección de la vida acuática en aguas dulces es de  $0.22\mu\text{g L}^{-1}$  y en aguas saladas de  $0.034\mu\text{g L}^{-1}$ . Para el agua residual tratada, el límite máximo es de  $0.023\text{mg L}^{-1}$  para el  $\alpha$ -endosulfán y de  $0.029\text{mg L}^{-1}$  para el  $\beta$ -endosulfán y el sulfato endosulfán. Para aguas que tienen otro destino el límite para el  $\alpha$ -endosulfán es de  $0.066\text{mg L}^{-1}$  y de  $0.13\text{mg L}^{-1}$  para el  $\beta$ -endosulfán y el sulfato de endosulfán.

El sulfato endosulfán está regulado y monitoreado como un compuesto orgánico tóxico en el parámetro “Orgánicos Tóxicos Totales” en las descargas de la fuente puntual. El término “Orgánico Tóxico Total” significa la suma de las masas o concentraciones de todos los compuestos orgánicos totales encontrados en la descarga a una concentración mayor a  $0.010\text{mg L}^{-1}$ . En cuanto a su toxicidad, el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) del Centro para la Prevención y Control de enfermedades (CDC) de E.U.A recomienda que el endosulfán deba ser incluido en el Grupo 1 de plaguicidas, los cuales representan un



riesgo a la salud incluso a concentraciones bajas dado que son cancerígenos, teratogénicos, neurotóxicos o con efectos reproductivos.

### **1.2.3 Legislación y panorama mundial.**

Más de 60 países, que incluyen la Unión Europea, E.U.A, Australia, Brasil, México y varias naciones de Asia y África occidental han prohibido su uso o han anunciado su próxima prohibición (Cubby, 2010), a pesar de lo anterior, aún se usa extensamente en algunos países como India y China. En el caso particular de México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios anunció la prohibición definitiva en la importación de endosulfán a partir del 1 de Enero de 2015 y la destrucción de cualquier remanente en anaqueles en todo el territorio nacional a partir del 1 de Enero de 2016.

### **1.3 Mecanismos enzimáticos en la degradación de plaguicidas por hongos de pudrición blanca.**

Los hongos de pudrición blanca de la madera son el más importante grupo de microorganismos responsables de la biodegradación del polímero natural más complejo que existe, la lignina. Debido a que sus características metabólicas les confieren la habilidad de utilizar sustratos no convencionales, económicos y abundantes como es el caso de los residuos agro-industriales y de la industria maderera, su utilización en procesos biotecnológicos se ha popularizado. El metabolismo ligninolítico, generalmente denominado “sistema de degradación de lignina” (SDL) es inducido por deficiencia o limitación de nutrientes, principalmente nitrógeno y carbono (Bucke, 1998; Moreira *et al.*, 2000). La acción del SDL es estrictamente extracelular y en él intervienen un grupo de hemoproteínas extracelulares conocidas como lignina peroxidasa (LiP) y la Manganese peroxidasa

(MnP), un grupo de enzimas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (glioxal oxidasa, aryl alcohol oxidasa, entre otras), un grupo de oxidasas (lacasas), alcohol veratrílico, manganeso y ácidos orgánicos como oxálico o malónico.

Se ha demostrado que el mecanismo oxidativo de las enzimas ligninolíticas, cataliza la degradación de gran cantidad de xenobióticos incluyendo hidrocarburos poliaromáticos, cloroaromáticos, dioxinas, tintes entre otros, que presenten potenciales de ionización (PI)  $\leq 7.55$  eV (Hammel *et al.*, 1986; Christian *et al.*, 2005).

La enzima lacasa cataliza la oxidación de sustratos fenólicos y otros sustratos como antraceno y benzo(a)pyreno (Collins *et al.*, 1996). Sobre este planteamiento, el conocimiento previo de los PI de contaminantes orgánicos de interés, por ejemplo determinándolo por voltametría cíclica (Riahi *et al.*, 2007), permitiría saber si las enzimas ligninolíticas de estos hongos son o no útiles para su biodegradación. Para el caso del endosulfán, hasta nuestro conocimiento, no existe reporte sobre su potencial de ionización. Ciertos co-oxidantes como compuestos orgánicos sulfurados (Glutación, L-cisteína, etc.), así como ácidos grasos insaturados y sus derivados (ej. Ácido linoléico, Tween 80) son oxidados por el sistema de las MnP y lacasas para formar radicales tiol y peroxil altamente reactivos, los cuales pueden atacar compuestos recalcitrantes que normalmente no son atacados directamente por las MnP, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos de entre tres y seis anillos (Bogan y Lamar, 1996; Hofrichter, 2002). Este mecanismo conocido como peroxidación, eleva la capacidad oxidativa del sistema ligninolítico a compuestos con PI de hasta 8.3 eV (Bogan y Lamar, 1996).

**Tabla 4.** Capacidad de degradación de plaguicidas por hongos de pudrición blanca.

Plaguicida	Hongos	Observaciones	Degradado (%)	Referencia
DDT	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. sajor-caju</i> <i>P. florida</i> <i>P. eryngii</i> <i>T. versicolor</i>	Líquido estéril. pH 5. 20d tratamiento. 30c°	66-92	(Arisoy 1998)
Lindano	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. sajor-caju</i> <i>P. florida</i> <i>P. eryngii</i> <i>P. sordia</i> <i>T. hirsuta</i> <i>C. bulleri</i>	Líquido estéril. pH 6.8. 20-28 días tratamiento. 25-35 c°. Suelo estéril franco limoso. 9 semanas 25c°	11-90	(Arisoy, 1998; Kennedy <i>et al.</i> , 1990; Mougin <i>et al.</i> , 1996; Quintero <i>et al.</i> , 2008; Quintero <i>et al.</i> , 2007; Singh y Kuhad, 1999; Singh y Kuhad, 2000; Tekere <i>et al.</i> , 2002)
Clordano	<i>P. chrysosporium</i>	Líquido estéril. pH 4,5. 3 d de tratamiento. 37°C	28.3	(Bumpus <i>et al.</i> , 1988)
Heptachol	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. florida</i> <i>P. sajor-caju</i> <i>P. eringii</i>	Líquido estéril. pH 4,5. 3 d tratamiento.	27-97	(Arisoy, 1998; Bumpus <i>et al.</i> , 1988)
Clorpirifos	<i>P. chrysosporium</i>	Líquido estéril. pH 4.5. 3 d tratamiento. 37C°	92.3	(Bumpus <i>et al.</i> , 1993)

### 1.3.1 Manganese peroxidases (MnP)

Las MnP ejercen su acción oxidativa indirectamente a través de la formación de radicales  $Mn^{+3}$  a partir del  $Mn^{+2}$ . El  $Mn^{+3}$  se estabiliza formando quelatos con ácidos carboxílicos (ej. oxálico, malónico, málico, tartárico, láctico) que actúan como mediadores difusibles de baja masa molecular eliminando electrones e hidrógenos inespecíficamente a moléculas orgánicas (Hofrichter, 2002). Estos radicales libres, son sustancias altamente oxidantes que pueden difundirse y penetrar en matrices en

las que las propias enzimas no lo pueden hacer y así aumentar la biodisponibilidad de sustratos y xenobióticos implicados en este tipo de metabolismo microbiano.

### **1.3.2 Lacasas**

Las lacasas fúngicas (bencendiol:oxígeno oxidorreductasa, E.C. 1.10.3.2) son glicoproteínas extracelulares pertenecientes al grupo de las fenol oxidasas y son producidas por el micelio de la gran mayoría de los basidiomicetos, aunque no son exclusivas de los mismos ya que se han detectado especies de ascomicetos y deuteromicetos capaces de producirlas (Bollag y Leonowicz, 1984). Catalizan la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación  $P^{2+}$  que les confieren una coloración azul. Oxida ácidos fenólicos y metoxifenólicos, pero se han identificado los descarboxila (Agematu *et al.*, 1993) y ataca sus grupos metoxilo mediante desmetilación o desmetoxilación (Potthast *et al.*, 1995). Todas estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina. La lacasa también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o despolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso molecular (Bourbonnais *et al.*, 1995).

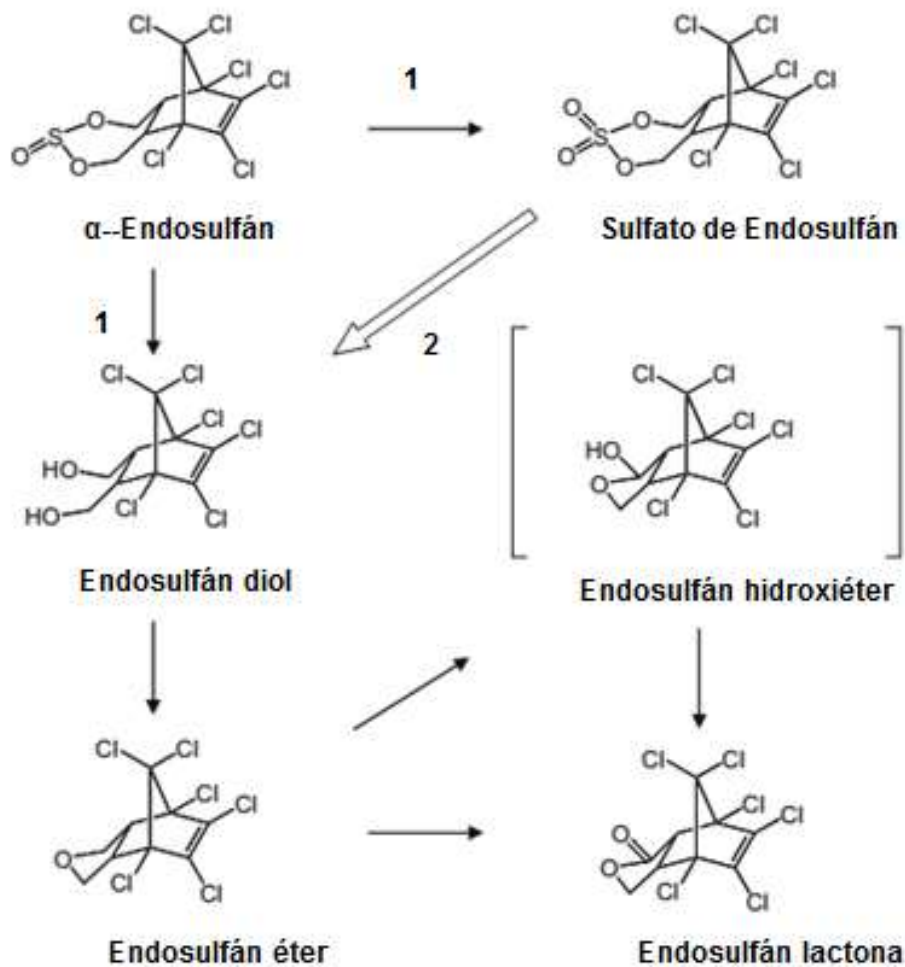
### **1.4 Degradación de Endosulfán.**

El  $\beta$ -endosulfán es más persistente que su isómero  $\alpha$ -endosulfán. El sulfato de endosulfán es el principal producto de la degradación de ambos isómeros, es igualmente tóxico y es por sí mismo más persistente en el medio ambiente que sus compuestos de origen (Berntssen *et al.* 2008), el resto de los metabolitos

detectados durante estudios de biodegradación poseen una toxicidad baja o nula y no presentan persistencia en el ambiente. El endosulfán puede descomponerse por fotólisis, hidrólisis ácida o básica y biodegradación.

#### **1.4.1 Degradación por basidiomicetos.**

Kullman y Matsumura (1996) estudiaron el metabolismo del endosulfán en el basidiomiceto modelo *Phanerochaete chrysosporium*; en este estudio, se observó una rápida desaparición de endosulfán, así como la detección de diferentes metabolitos: endosulfán sulfato, endosulfán diol, endosulfán hidroxietter, y endosulfán dialdehído. Kullman y Matsumura teorizaron que el metabolismo del endosulfán está mediado en dos diferentes rutas: una oxidativa, cuyo metabolito principal es el sulfato de endosulfán, y una ruta hidrolítica (menos frecuente) donde el principal metabolito producido es el endosulfán diol. En 2011, Kamei y colaboradores presentaron las primeras evidencias de un proceso de biorremediación con un hongo de pudrición blanca (*Trametes hirsuta*) capaz de degradar endosulfán sin la acumulación de sulfato de endosulfán. Kamei y su equipo concluyen que *T. hirsuta* posee un metabolismo similar a *P. chrysosporium* con la notable diferencia de que *T. hirsuta* es capaz de metabolizar endosulfán sulfato, presumiblemente por procesos oxidativos posteriores (Figura 2).



**Figura 2.** Rutas teorizadas en la degradación biológica de endosulfán. (1) Kullman y Matsumura, 1996 (2) Kamei et al., 2011

#### 1.4.2 Degradación por micromicetos

Hussain y colaboradores (2007) realizaron una selección de 16 cepas fúngicas asiladas de suelos impactados con plaguicidas de las cuales seleccionaron 3: *Aspergillus terricola*, *Aspergillus terreus* y *Chaetosartorya stromatoides*. Posterior a esta selección realizaron ensayos de degradación in vitro logrando remociones superiores al 90% ( $C_i = 100$  ppm, 12 días de incubación) sin la acumulación del metabolito tóxico sulfato de endosulfán.

En 2011, Balherao y colaboradores estudiaron la biorremediación de endosulfán por *Aspergillus niger* en suelos empleando técnicas de bioaumentación. Sus resultados muestran una degradación del 100% de endosulfán a partir del día 15 de incubación y un degradación del 100% de sulfato de endosulfán a partir del día 11. Estos resultados sugieren que la degradación de endosulfán y endosulfán sulfato puede ser realizada por rutas 100% hidrolíticas, ya que en estos hongos no se ha reportado la actividad de enzimas ligninolíticas, que son comunes en los basidiomicetos.

Recientemente, se estudió la degradación de endosulfán en medio líquido empleando *Aspergillus tamaris* y *Botryosphaeria laricina* (Silambarasan *et al*, 2013). Ambas cepas fueron capaces de transformar al endosulfán utilizándolo como fuente única de carbono a una concentración de 1000 ppm produciendo sulfato de endosulfán, endosulfán éter y endosulfán diol.

#### **1.4.3 Co-cultivos.**

En un co-cultivo, la degradación de sustratos ocurre por la actividad metabólica combinada de dos cepas conocidas crecidas en un medio aséptico. En un hábitat natural, diferentes microorganismos pueden competir por un mismo sustrato, así como actuar simbióticamente. Muchos microorganismos han desarrollado mecanismos para proteger sus sustratos así como para defender su hábitat contra organismos competidores (Bader *et al.*, 2010). Existe una serie de instancias donde la utilización de co-cultivos parece ser ventajosa comparada con la utilización de cultivos axénicos, esto debido a que esta técnica ofrece un gran potencial para la utilización sinérgica del complejo metabólico de ambos organismos que estimule la producción de compuestos de interés o para llevar a cabo procesos benéficos (Bader *et al.* 2010). Ejemplos de esta utilización ventajosa de co-cultivos son

numerosos y van desde la obtención de químicos a granel, antibióticos y fármacos, hasta aditivos alimenticios, enzimas y celdas de combustible microbianas

Dentro del área de bioprocesos, los esfuerzos en investigación y desarrollo tecnológico están enfocados principalmente en la producción de proteínas más estables y económicas a través de la optimización de procesos de aislamiento y purificación, y del mejoramiento de organismos productores por técnicas de genética y biología molecular (Karam & Nicell, 1999; Durán & Esposito, 2000; Bader, 2010). Ha sido hasta hace relativamente poco tiempo que se han empezado a aplicar técnicas de cultivo simultáneo de dos especies diferentes (co-cultivos) para promover la producción de metabolitos de interés.

En el co-cultivo de *Aspergillus fumigatus* y *Streptomyces bullii* se detectaron un total de 10 metabolitos los cuales no fueron detectados cuando los cultivos crecían de forma independiente (Rateb *et al.* 2013). En otra investigación se reportó una inducción de 5 metabolitos en un co-cultivo fúngico entre el sordariomiceto *Bionectria ochroleuca* y el hongo antropofílico *Trichophyton rubrum* (Bertrand *et al.* 2013), ninguno de estos metabolitos fue detectado cuando los hongos crecieron por separado. En Investigaciones realizadas con un co-cultivo de *Pleurotus ostreatus* y la cepa mutante *Penicillium oxallicum* SAU E-3.5 utilizando residuos agroindustriales como sustrato se logró incrementar la actividad de las enzimas ligninocelulolíticas xilanasas y lacasa en un 58% y 33% con respecto a su producción en monocultivos (Dwivedi *et al.* 2011). Otro estudio registró un orden de incremento del 80 % en la actividad de lacasa utilizando diferentes co-cultivos con diversos basidiomicetos y ascomicetos del género *Trichoderma*, dichos co-cultivos se realizaron empleando diferentes residuos agroindustriales como sustrato y material soporte para los microorganismos (Luo, 2010).



#### **1.4.4 Uso de co-cultivos en biorremediación y en la producción de lacasa.**

La aplicación de co-cultivos en procesos de biorremediación es un área emergente de la biotecnología que ha generado un interés creciente debido, entre otras cosas, a que en muchos casos ofrece altos rendimientos en el tratamiento de compuestos de difícil degradación, a costos más bajos y tiempos más cortos en comparación con procesos convencionales (Boonchan *et al.* 2000; Liu *et al.* 2008).

Liu *et al.*, (2008) reportaron el efecto sinérgico entre *Mycobacterium sp.* y *Cladosporium sp.* durante la degradación de contaminantes derivados de diésel. La utilización de un co-cultivo del hongo *Penicillium janthinellum* y la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* ofrece la posibilidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos con 5 anillos bencénicos (Boonchan *et al.*, 2000), conocidos por ser altamente cancerígenos. En 2007, Kim y Lee detectaron la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizando un co-cultivo de *Penicillium sp.* y *Rhodococcus sp.* Los autores proponen un mecanismo donde el metabolismo enzimático del hongo interviene generando una mayor solubilidad del contaminante, después, la bacteria es capaz de catalizar las diferentes etapas de oxidación. Takahashi y colaboradores (2008) desarrollaron un proceso para el tratamiento de los plaguicidas tris (2-cloroetil) fosfato y tris (1,3-dicloro-2-propil) fosfato utilizando un cultivo mixto de *Acidovorax sp.*, *Sphingomonas sp.* y *Aquabacterium sp.* Este proceso también fue capaz de degradar los metabolitos tóxicos mediante procesos de dechloración.

En la industria biotecnológica, el aumento en el rendimiento de producción de lacasa se logra generalmente mediante la adición de inductores químicos; esta estrategia resulta, en la mayoría de los casos, costosa y poco ecológica. La inducción de

lacasa mediante la utilización de co-cultivos representa una alternativa real para superar dichos inconvenientes. En los últimos años, diferentes investigaciones se han realizado en relación a la inducción de lacasa fúngica (Tabla 5)

**Tabla 5.** Estudios realizados sobre la inducción de la actividad de lacasa en Co-cultivos. Los porcentajes de incremento son en relación al control

Microorganismos	Incremento (%)	Observaciones	Referencia
<i>Rhizoctonia solani/ Pseudomonas fluorescens</i>	NC	Medio líquido	Crowe y Olsson, 2001
<i>Penicillium rugulosum/ T. versicolor</i>	2490	Medio líquido. Adición del micromiceto a los 11 d de crecimiento.	Baldrian, 2004
<i>P. ostreatus/ P. chrysosporium</i>	800-1200	SSF con diferentes residuos lignocelulósicos como sustrato. Max act: 15-20 días	Verma y Madamwar, 2002
<i>Trametes sp./ Trichoderma sp.</i>	-	Medio líquido Xylosa-triptona. Lacasa no detectada en monocultivos.	Zhang et al., 2006
<i>Aspergillus oryzae/ P. chrysosporium</i>	150	Medio líquido con salvado de trigo como fuente de carbono. 30 C°	Hu et al., 2010
<i>Trametes maxima/ Paecilomyces carneus</i>	250	Medio líquido. Inoculación del micromiceto al día 3.	Chan-cupul et al., 2015.

### 1.5 Biorreactores en la producción de enzimas.

La aplicación exitosa de procesos enzimáticos en técnicas de biorremediación requiere una alta producción de las enzimas en cuestión. Estos altos rendimientos normalmente solo han sido obtenidos a nivel laboratorio mediante técnicas de estimulación por adición de una gran variedad de compuestos, muchos de ellos xenobióticos (Kahraman y Yesilada, 2001; Mougin, et al. 2002) o mediante la

modificación de cepas por ingeniería genética. En 2002, Hess y colaboradores reportaron una disminución considerable en la producción de lacasa extracelular por *Trametes versicolor* cuando la fermentación fue llevada a cabo dentro de un reactor de tanque agitado, esto presumiblemente debido a daños en el micelio del hongo y cambios en la morfología del mismo causados por el esfuerzo de corte.

Rancaño *et al.*, (2003) estudiaron la producción de lacasas por células libres de *Trametes versicolor* cultivado en sistema por lote alimentado dentro de un reactor tipo Airlift. Para lograr estimular la producción de la enzima, se utilizó 2-5 xilidina como agente inductor y glucosa como fuente de carbono logrando actividades sostenidas por 40 días de hasta 1649 U/L. En 2007, Rodríguez-Couto reportó actividades de máximas de lacasa de 19 400 U/L por utilizando el basidiomiceto *Trametes hirsuta* en un sistema por lote alimentado utilizando glicerol como inductor dentro de un reactor airlift. Los resultados superan los reportados en trabajos con reactores de tanque agitado utilizando *T. versicolor*. Thiruchelvam y Ramsay (2007) obtuvieron una actividad máxima de 1349 U/L, mientras que Park y colaboradores (2006) reportaron 1000 U/L. Lo anterior sugiere, entre otras cosas, que el hongo, al crecer en condiciones de menor estrés mecánico y menor esfuerzo de corte puede producir enzimas funcionales en mayor cantidad y por más tiempo.

### **1.6 Reactores tipo airlift.**

Un reactor airlift (ALB) es un equipo agitado neumáticamente cuya característica principal es que el suministro de energía para mantener la homogeneidad en su interior tiene lugar mediante la expansión isotérmica de un gas introducido (Chisti, 1989). Los ALB pueden funcionar como sistemas gas-líquido o gas-líquido-sólido, caracterizados por la circulación de fluido en un patrón cíclico definido, a través de

canales diseñados específicamente para este propósito. El contenido del reactor es mezclado por una corriente de aire u otros gases; así mismo, esta corriente facilita la transferencia de masa (oxígeno u otro gas) entre la fase gaseosa y el medio. Usualmente, se transfiere oxígeno al líquido y en algunos casos se pueden remover productos de la reacción.

Estos no requieren de agitación mecánica, sino que se establece un patrón de flujo en base a la diferencia de densidades que provoca la retención diferencial de gas entre las secciones de ascenso y descenso del fluido. La exclusión de la agitación mecánica brinda un ambiente de menor estrés mecánico (Merchuk & Gluz, 2002). En los tanques agitados, la energía requerida para el movimiento del fluido se aplica en un solo punto en el reactor, el agitador, por lo tanto, la disipación de la energía es alta alrededor del agitador y disminuye al alejarse de este. De forma análoga, el estrés mecánico será mayor en la zona del agitador, y se genera un gradiente hacia las paredes del reactor. Así, las células dentro de un reactor agitado están expuestas a ambientes contrastantes; ya sea por zonas con poco mezclado donde existen gradientes de temperatura o de concentración de sustrato o por regiones altamente turbulentas con gradientes en el esfuerzo de corte que dañan las estructuras celulares o influyen en su morfología y metabolismo (Chisti y Jáuregui-Haza, 2002).

En base a los atributos antes mencionados, en algunos casos se han elegido ALB's para el tratamiento de aguas residuales. Jin y colaboradores (2002) utilizaron un ALB a escala piloto para el tratamiento de agua residual del procesamiento del almidón con "pellets" de dos hongos: *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oligosporus*. Se logró una remoción de 95% de DQO, 93% de DBO y 98% de sólidos suspendidos.

Los ALB han sido investigados para tratar aguas residuales de distinta índole empleando materiales como arena, basalto, materiales cerámicos y polímeros biodegradables que sirven como soporte y/o sustrato para el desarrollo de los microorganismos en el sistema. La evidencia experimental sugiere que la producción de enzimas empleando hongos de pudrición blanca es más eficiente en un ALB que en otros reactores agitados. Hess *et al.* (2002) reportaron una disminución del 70% en la producción de lacasa por *Trametes multicolor* cuando el hongo se cultivó en un reactor de tipo tanque agitado. Fenice (2003) confirmó el efecto negativo en la producción de esta enzima empleado reactores de tanque agitado; ambos grupos sugieren que la baja en la actividad enzimática en reactores que emplean agitación mecánica se debe al daño de los micelos debido al esfuerzo de corte generado dentro del sistema. Rodríguez-Couto *et al.* (2006) reportaron una actividad de lacasa de 19 400 U L<sup>-1</sup> empleando un cultivo de células libres de *Trametes hirsuta* en un ALB utilizando glicerol y sulfato de cobre como inductores, ésta producción enzimática, hasta nuestro conocimiento, es la segunda más alta reportada en reactores a escala laboratorio (1.5 – 10 L). Otra ventaja operacional importante que presentan los ALB radica en que la actividad enzimática es estable durante periodos prolongados incluso en fermentaciones por lote. Estudios realizados por Rancaño *et al.* (2003) utilizando cultivos de *T. versicolor* en un ALB para la degradación de azo-colorantes mostraron que la actividad enzimática de lacasa fue constante durante toda la fermentación (40 días) determinándose la mayor actividad a pH 3 y llegando a retenerse más del 70% de la máxima actividad a pH 5 hasta por 12 días. Hasta la fecha, no existen reportes de remediación de endosulfán en sistemas ALB.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La alta demanda de alimentos ha vuelto necesario que en la actualidad se requiera del uso de plaguicidas sintéticos para lograr altos rendimientos en el sector agrícola, por desgracia, la falta de especificidad de muchos de ellos y su uso indiscriminado, ha originado diversos perjuicios a la salud humana y ambiental. El endosulfán es un plaguicida organoclorado que tiene elevada toxicidad aguda, su metabolización ocurre de manera rápida, y su principal metabolito oxidado, el sulfato de endosulfán, presenta una toxicidad equivalente a la del compuesto original. Se ha demostrado que los hongos de pudrición blanca tienen un alto potencial para la degradación de una amplia gama de moléculas tóxicas entre las que se incluyen plaguicidas organoclorados, sin embargo, uno de los retos más importantes en estos procesos de biorremediación es obtener altos rendimientos en la producción de enzimas extracelulares. Ante esto, se han empleado técnicas como la inducción a través de químicos y la modificación genética de organismos, sin embargo, dichas estrategias suelen ser costosas y poco amigables con el ambiente. La utilización de co-cultivos para la inducción de enzimas representa una alternativa viable para economizar, volver más eficientes y brindar mayor sustentabilidad a los sistemas de biorremediación con hongos.

El presente proyecto plantea la utilización de co-cultivos en un reactor tipo airlift, el cual, debido a la ausencia de agitadores mecánicos y al poco esfuerzo de corte que esto conlleva, genera poco daño celular en el micelio, lo que permite a los hongos una mayor producción de enzimas que conservan funcionalidad por mayor tiempo. A su vez, el mantenimiento de estos reactores es simple y su operación no exige una alta demanda energética ya que el aire cumple con las funciones de aireación y agitación.

### **3. HIPÓTESIS**

El empleo de co-cultivos micromicetos/basidiomicetos utilizando residuos lignocelulósicos como sustrato y soporte, logrará una eficiencia de degradación de endosulfán  $\alpha$  y  $\beta$  superior al 85% y una producción de sulfato de endosulfán inferior al 15%.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la degradación de endosulfán en un sistema de reactor airlift por lote mediante la aplicación de co-cultivos utilizando residuos lignocelulósicos como sustrato.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Seleccionar las cepas fúngicas que presenten una mejor eficiencia de degradación de endosulfán y endosulfán sulfato.
2. Seleccionar las condiciones y sustratos óptimos para la producción de inóculos por el proceso de fermentación en sustrato sólido (SSF).
3. Evaluar la producción de lacasa, MnP y proteína total utilizando co-cultivos y monocultivos inmovilizados en residuos lignocelulósicos y determinar el rendimiento de cada tratamiento.
4. Determinar las condiciones adecuadas de operación del reactor airlift en un proceso por lote.
5. Evaluar la degradación de endosulfán en un agua residual sintética en un sistema por lote dentro de un reactor tipo airlift empleando los co-cultivos más eficientes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Ensayos toxicológicos.

La búsqueda de especies con capacidad para tolerar altas concentraciones de endosulfán es el primer paso a considerar en la selección de cepas candidatas para estudiar la micodegradación de endosulfán en suelo o agua. Para ello, se realizaron bioensayos dosis respuesta de 22 cepas (Tabla 5) pertenecientes al cepario del laboratorio de xenobióticos en el departamento de biotecnología del CINVESTAV-IPN. Todas las cepas se reactivaron en agar papa-dextrosa (APD) y se incubaron a 30 °C durante 10 días antes de su utilización en los bioensayos. Al finalizar los bioensayos se realizó la cuantificación de la actividad de las enzimas lacasa y MnP.

**Tabla 6.** Organismos estudiados en los bioensayos dosis respuesta. Todas las cepas has sido aisladas por el grupo de trabajo del laboratorio de xenobióticos del CINVESTAV-IPN y estudiadas con anterioridad en procesos de biorremediación

Basidiomicetos	Micromicetos
<i>Pleurotus</i> sp. Tlalne I	<i>Paecylomices formosus</i>
<i>Trametes máxima</i> Tloco – I	<i>Fusarium</i> sp. ID 2
<i>Dendropsopus elegans</i>	<i>Penicillium pinophilum</i>
<i>P. chrysosporium</i> A 594	<i>Aspergillus tamarii</i> . ID 3
<i>Trametes</i> sp.	ID 4
<i>L. edodes</i> ATCC 32720 Tlalne III	ID 5 <i>Aspergillus</i> sp.
<i>P. Sanguineus</i> SBM 3	<i>Paecylomices carneus</i>
<i>P. Sanguineus</i> Actopan	<i>Trichoderma</i> sp.

#### 5.1.1 Condiciones y método de siembra.

Como fuente de endosulfán se utilizó la formulación comercial Algodán© 350 (Bravo AG, México) la cual tiene una concentración aproximada de 38% p/v de ingrediente activo endosulfán. Como medio de cultivo se utilizó el medio libre de azufre



reportado por Hussain *et al.*, 2007 (Tabla 7), éste fue esterilizado a 121 °C por 20 min, se dejó enfriar a  $50 \pm 2$  °C y se le añadieron diferentes concentraciones de endosulfán, posteriormente se vertió en cajas Petri (0.9 cm Ø), las concentraciones finales de endosulfán fueron 1000, 500, 250 125 y 0 (control) partes por millón (ppm) para cada organismo estudiado. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Para la siembra, se tomó un disco de 6 mm de diámetro de los cultivos en APD, se inoculó al centro de cada caja Petri y los cultivos se mantuvieron en incubación a 30 °C. Se realizaron mediciones del crecimiento micelial desde la parte posterior de cada caja con una frecuencia de 12 hrs utilizando una escuadra milimétrica. Cada bioensayo concluyó una vez que el tratamiento control (0 ppm de endosulfán) cubrió el 100% de la caja de Petri.

**Tabla 7.** Composición medio libre de azufre. Hussain *et al.*, 2007

<b>Componente (Marca, procedencia)</b>	<b>Concentración (por litro)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	0.225 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	0.225 g
NH <sub>4</sub> Cl (JT Baker, E.U.A)	0.225 g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (Sigma, E.U.A)	0.845 g
CaCO <sub>3</sub> (Reasol, México)	0.005 g
FeCl <sub>2</sub> (Reasol, México)	0.005 g
D – glucosa (Reasol, México)	1 g
Sol. Traza (Tabla 8)	1 mL
Agar noble (Difco, E.U.A)	20 g

**Tabla 8.** Composición solución traza medio libre de azufre

<b>Componente (Marca, procedencia)</b>	<b>(g/L)</b>
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O (JT Baker, E.U.A)	0.198
ZnCl <sub>2</sub> (JT Baker, E.U.A)	0.136
CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Meyer, México)	0.171
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (Merck, Alemania)	0.024
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (Sigma, Alemania)	0.024

### **5.1.2 Variables de crecimiento.**

El crecimiento relativo (%) se calculó al dividir el diámetro de cada colonia entre el diámetro de la colonia control y multiplicando este valor por 100.

La tasa media de crecimiento se calculó mediante la división del tamaño de la colonia al concluir el ensayo entre el número de días que duró el mismo, y fue reportada en mm/día. La concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) fue definida como la concentración de endosulfán necesaria para inhibir el 50% del crecimiento del hongo.

## **5.2 Obtención de extractos enzimáticos**

### **-Cultivos *in vitro***

Se obtuvo según la metodología reportada por Mata y Savoie (1998). Se tomaron discos de (0.6cm Ø) directamente del micelio en crecimiento y se suspendieron en agua des-ionizada a una relación de 1mL/disco contenida en tubos falcon de 50 mL. Los tubos fueron colocados en un agitador rotacional a 150 rpm y temperatura ambiente durante 2 horas. El sobrenadante se separó por filtración al vacío.

### **-Cultivos en Fermentación en Estado Sólido (SSF)**

Se utilizaron tubos cónicos de 100 mL agregando 40 mL de agua desionizada al final de cada tratamiento. Las muestras posteriormente se dispusieron en agitación rotacional (150 rpm) por 1 h. Posteriormente la mezcla fue clarificada por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. Por último, se separó el sobrenadante utilizando una pipeta de vidrio (Adaptado de Barrios-González *et al.* 1988).

### 5.3 Preparación de soluciones de esporas.

Utilizando un sacabocado se tomaron discos de 6 mm de diámetro directamente de una colonia de al menos 6 días de edad crecida en medio APD y se depositaron en 1 mL de una solución (0.05% v/v) de agua desionizada y el surfactante Tween 80. Para la determinación de la concentración de esporas se empleó una cámara de Neubauer siguiendo la técnica publicada por Madigan y colaboradores (2004). Las soluciones de esporas obtenidas se guardaron en refrigeración (5°C) hasta su uso no posterior a 1 mes.

### 5.4 Actividad de Lacasa

Se determinó en un equipo Shimadzu UV 1800 (E.U.A) mediante la cuantificación espectrofotométrica del cambio de absorbancia a 420 nm generado por la oxidación de 100 µL de ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) (Sigma, E.U.A) 5 mM en 600 µl de acetato de sodio 0.1 M (pH=4.5) utilizando 300 µL de extracto enzimático. (Mata y Savoie, 1998). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de lacasa capaz de oxidar 1µmol de ABTS por minuto y se reportó en unidades por litro (U L<sup>-1</sup>). El cálculo de la actividad de lacasa se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de Lacasa} \left( \frac{U}{L} \right) = \frac{\Delta ABS \cdot Vt}{t \cdot \epsilon \cdot \gamma \cdot Vm} (1000000)$$

Dónde:

Vt = Volumen total (1 mL)

t = Tiempo de reacción (3 min)

ε= Coeficiente de extinción molar (3600 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

γ= Diámetro de celda (1 cm)

Vm= Volumen de muestra (0.3 mL)

### 5.5 Actividad de Manganeso Peroxidasa

La actividad de MnP se determinó mediante la cuantificación de la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm de la siguiente mezcla de reacción: 700 µL de extracto enzimático, 50 µL de rojo fenol (Sigma, E.U.A) al 0.2%, 50 µL de lactato de sodio 0.5 mM, 50 µL de albúmina de huevo al 0.1%, 50 µL de sulfato de manganeso (JT Baker, E.U.A) 2 mM y 50 µL de peróxido de hidrógeno (Meyer, Canadá) 2 mM y 50 µL de buffer succinato sódico 20 mM a pH=4.5 (Kuwahara et al. 1984). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de MnP capaz de oxidar 1µmol de rojo fenol por minuto y fue reportada en U L<sup>-1</sup>. La cuantificación de la actividad de MnP se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de MnP} \left( \frac{U}{L} \right) = \frac{ABS \cdot Vt}{t \cdot \epsilon \cdot \gamma \cdot Vm} (1000000)$$

ABS= Absorbancia de la muestra a 610 nm

Vt = Volumen total (1 mL)

t = Tiempo de reacción (5 min)

ε= Coeficiente de extinción molar (4460 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

γ= Paso de haz de luz (1 cm)

Vm= Volumen de muestra (0.7mL)

## 5.6 Proteína Extracelular

Se cuantificó a través del método colorimétrico establecido por Bradford (1976). Para la determinación se mezclaron 500 uL de extracto enzimático con 500 µL de reactivo de Bradford (Tabla 9) y se determinó la absorbancia a 595 nm, La concentración de proteína total (mg/mL) se correlacionó a partir de una curva de calibración realizada utilizando albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones (0.006 - 0.012 - 0.024 - 0.048 - 0.096 - 0.192 mg/mL). No se utilizó micro-método.

**Tabla 9.** Composición de solución Bradford. Todos los reactivos fueron grado estándar o superior. Las concentraciones se muestran para un volumen final de 1L en agua destilada

<b>Componente (Procedencia)</b>	<b>Concentración (p/v)</b>
Azul de Coomassie G-250 (Sigma, E.U.A)	0.01
Etanol absoluto (Reasol, México)	4.7
Ácido fosfórico (JT Baker, E.U.A)	8.5

### **5.7 Análisis estadísticos**

El cálculo de la  $CE_{50}$ , intervalos de confianza y el correspondiente valor del estadístico  $X^2$  para cada ensayo toxicológico se realizó mediante un análisis de regresión avanzada tipo “Probit” utilizando el paquete estadístico SAS 8.1 (E.U.A). Los Análisis de Varianza y las comparaciones de medias por la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher se hicieron en PASW statistics 18 (E.U.A). Los gráficos de barras y de líneas se obtuvieron en el programa GraphPad Prism 6 (E.U.A). Los diseños experimentales de superficie respuesta fueron analizados con los software Design Expert 9 y Statgraphics 5.1.

### **5.8 Pruebas de degradación en cultivo líquido por lote.**

Las pruebas de degradación se llevaron a cabo en base a la metodología propuesta previamente por Kamei y colaboradores (2010). Como inóculo se utilizaron cultivos de los organismos *Trametes maxima*, *Pycnoporus sanguineus* SBM 3, *Pleurotus* sp., *Trametes* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium pinophilum*, *Paecylomices formosus* y *Paecylomices carneus* incubados durante 7 días en cajas Petri con agar extracto de malta a 30 °C y en condiciones de oscuridad. Para la siembra se tomaron 12 discos de 6 mm de diámetro del micelio en crecimiento y se inocularon en matraces Erlenmeyer de vidrio de 125 mL con 30 mL de medio con nitrógeno limitado modificado (Tabla 10). Para determinar la degradación abiótica se realizó un

tratamiento blanco (sin inóculo). Los cultivos se incubaron estáticamente a presión atmosférica, 30°C y condiciones de oscuridad. Después de 6 días de incubación, se agregaron urea (5mM) como fuente de nitrógeno y  $\approx 5$  mg/L de endosulfán en su formulación comercial (Algodán 350), posteriormente todos los tratamientos continuaron en incubación hasta alcanzar 12 días. Para determinar la remoción por procesos de sorción se realizó un control para cada tratamiento en el cual los cultivos se sacrificaron con 0.4g de azida de sodio al sexto día y posteriormente se adicionó el endosulfán y la fuente de nitrógeno, seguido a ello, se incubaron de manera idéntica a los cultivos tratamiento hasta los 12 días. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

**Tabla 10.** Composición del medio con nitrógeno limitado (modificado de Kamei *et al.*, 2011)

<b>Componente (Procedencia)</b>	<b>Concentración (por litro)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	20 g
MgSO <sub>4</sub> (Merck, Alemania)	5 g
CaCl <sub>2</sub> (Meyer, México)	1 g
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Reasol, México)	10 g
Solución traza (Tabla 11)	100 mL

**Tabla 11.** Componentes solución traza medio nitrógeno limitado

<b>Componente (Procedencia)</b>	<b>Concentración (por litro)</b>
MgSO <sub>4</sub> (Meyer, México)	3 g
MnSO <sub>4</sub> (JT Baker, E.U.A)	0.5 g
NaCl (Meyer, México)	1 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (Sigma, E.U.A)	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> (Meyer, México)	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	0.1 g
AlK (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 12H <sub>2</sub> O (Sigma, E.U.A)	10 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Merck, Alemania)	10 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Merck, Alemania)	10 mg
CuSO <sub>4</sub> (Reasol, México)	0.1 g
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (Merck, Alemania)	0.5g

Al día 12 de tratamiento, la biomasa de los cultivos fue removida por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando un equipo IEC

Centra MP4R (U.S.A), se tomó el sobrenadante de los cultivos y se realizó la extracción en tres pasos con n-hexano grado HPLC (Honeywell, E.U.A) en proporción 1:1 recuperando la fase orgánica en frascos ámbar de 50 mL de acuerdo al método EPA 608; de igual manera se utilizó parte del sobrenadante para la determinación de actividad enzimática de lacasa y MnP. La eficiencia de extracción se determinó empleando estándares cromatográficos de  $\alpha$ ,  $\beta$  y sulfato endosulfán a una concentración conocida diluida directamente en hexano y comparando su cromatograma con el de una solución con la misma concentración diluida en agua desionizada y posteriormente sometida al proceso de extracción. La detección y cuantificación de los isómeros de endosulfán y endosulfán sulfato se realizó en un cromatógrafo de gases Varian CP-3380 (E.U.A.) equipado con un detector splitless/splitless de captura de electrones el cual emplea  $\text{Ni}^{63}$  como fuente emisora de partículas. La temperatura del inyector fue de  $200^{\circ}\text{C}$  y se empleó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de  $1.5\text{mL}/\text{min}$ . El cromatógrafo posee una columna capilar CD Sil. 5CB Varian de  $15\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\text{mm}$ . Las rampas de temperatura fueron  $80^{\circ}\text{C}$  durante un minuto y después incrementos de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  durante 8 minutos hasta alcanzar  $200^{\circ}\text{C}$ . La temperatura del detector fue de  $300^{\circ}\text{C}$ . El software para cromatografía utilizado fue Galaxie Workstation.

### **5.9 Evaluación de co-cultivos, ensayo de compatibilidad.**

Se evaluó la compatibilidad de los 4 basidiomicetos *Trametes maxima*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus sp.* y *Trametes sp.* con los micromicetos *Paecylomices formosus* y *Aspergillus tamarii*, los cuales presentaron altos niveles de remoción de endosulfán sin la acumulación de endosulfán sulfato. Los experimentos se realizaron por triplicado en cajas Petri con APD como medio, a  $30^{\circ}\text{C}$  y en condiciones de oscuridad. En cada caja se inocularon (en extremos opuestos): 1 disco de 6 mm de

diámetro tomado directamente del micelio en crecimiento del basidiomiceto y 5 µL de una solución de esporas (10<sup>6</sup> esporas/mL) del micromiceto. Las cajas se examinaron diariamente para estudiar el proceso de interacción. Se utilizó la escala (tabla 5) propuesta por Badalyan y colaboradores (2004) para determinar el índice de antagonismo (IA) de cada interacción.

El índice de antagonismo se define según la ecuación:

$$IA = \sum n \cdot i$$

Dónde

n= número (frecuencia) de cada tipo o subtipo de reacción;

i=puntaje correspondiente.

**Tabla 12.** Codificación según tipo de interacción

Clave	Tipo de interacción	Puntaje
A	Inhibición mutua con contacto entre los micelios.	1
B	Inhibición a distancia sin contacto entre los micelios.	2
C	Reemplazo completo sin inhibición inicial.	3
C <sub>A1</sub>	Reemplazo parcial después de inhibición inicial por contacto.	3.5
C <sub>B1</sub>	Reemplazo parcial después de inhibición inicial a distancia.	4
C <sub>A2</sub>	Reemplazo completo después de inhibición inicial por contacto.	4.5
C <sub>B2</sub>	Reemplazo completo después de inhibición inicial a distancia.	5

Al finalizar el análisis de interacción se determinó la actividad enzimática de lacasa y MnP de cada tratamiento.

### **5.10 Fermentación en sustrato sólido (SSF) de co-cultivos: Selección de tipo de sustrato y tiempo de fermentación.**

Se evaluaron los co-cultivos *Trametes sp./P. formosus* y *Trametes sp./A. tamaritii* en cajas Petri de 60x15 mm bajo condiciones SSF. Como sustrato se utilizaron 5g de alguno de los siguientes: cáscara de mandarina, cáscara de naranja, bagazo de caña o salvado de trigo. La cáscara de naranja, de mandarina y el bagazo de caña



fueron obtenidos de un mercado local y homogenizados a un tamaño de partícula aproximado de 5x5 mm. Se utilizó salvado de trigo comercial (Kretschmer, E.U.A). Todos los sustratos fueron pre-tratados con una solución de hipoclorito de sodio (0.5%) por 5 horas, posteriormente se lavaron con agua bi-destilada y se esterilizaron en autoclave durante 20 min (15 psi, 120 °C). Todos los tratamientos se ajustaron a un 70% de humedad con base a su capacidad de retención de agua (CRA). El porcentaje de humedad fue ajustado siguiendo el método reportado por Dwivedi y colaboradores (2011) a través de la adición calculada de medio salino (Tabla 13).

Tabla 13. Composición medio Dwivedi durante SSF

Componente (Procedencia)	Concentración g/L
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	2
MgSO <sub>4</sub> (JT Baker, E.U.A)	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	0.01
Extracto de levadura (Difco, E.U.A)	0.6
ZnSO <sub>4</sub> (JT Baker, E.U.A)	0.001
FeSO <sub>4</sub> (Merck, México)	0.005
MnSO <sub>4</sub> (Sigma, E.U.A)	0.05

*Trametes* sp. fue inoculado utilizando 3 discos de 0.6cm de diámetro obtenidos directamente del micelio en crecimiento. La inoculación con *P. formosus* o *A. tamaritii* se realizó 48h después de la de *Trametes* sp. a través de la adición de 15µL de una solución de esporas ( $\approx 5 \times 10^6$  esporas/mL). Se realizaron mediciones de lacasa, MnP y proteína extracelular a los: 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días de fermentación. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **5.11 Evaluación in vitro de la producción de lacasa del co-cultivo *Trametes* sp./ *P. formosus*: Influencia del tiempo y la etapa de crecimiento.**

Se estudió la variación en la actividad de la enzima lacasa durante las diferentes fases del desarrollo micelial de *Trametes* sp. en co-cultivo con *P. formosus*. Los co-

cultivos se realizaron en cajas Petri (90 mm Ø) con medio APD. La actividad de lacasa en fue evaluada cada 24 hrs durante 10 días y a partir del 11vo día se evaluó cada 72 hrs hasta alcanzar un total de 29 días.

*Trametes* sp. fue inoculado tomando un disco de 6 mm de diámetro directamente del micelio en crecimiento de un organismo con 6 días de desarrollo. *P. formosus* se inoculó utilizando 10 µL de una solución de esporas ( $\approx 4.8 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ). Cada hongo fue sembrado en los extremos opuestos de una caja Petri de 90 x 15 mm con 20 mL de PDA previamente esterilizado y fueron puestos en incubación a 30°C y condiciones de oscuridad.

#### **5.12 Efecto del tamaño de inóculo en el crecimiento vegetativo de *P. formosus*.**

Se evaluó el efecto de disminuir el inóculo del hongo *P. formosus* sobre su crecimiento vegetativo. El tamaño del inóculo utilizado para cada tratamiento se presenta en la tabla 14.

Todos los tratamientos fueron sembrados en cajas Petri de 90x15 mm utilizando 5 µL de una solución de esporas a 5 diferentes concentraciones (Tabla 14). Como medio de cultivo se utilizó 15 mL de PDA y se incubó a 30°C en condiciones de oscuridad hasta que la caja fue cubierta completamente por micelio. El experimento se definió como un modelo unifactorial completamente aleatorizado donde la variable independiente fue la concentración de esporas en el inóculo y las variables de respuesta fueron la tasa media de crecimiento y la densidad de esporas por cm<sup>2</sup>.

**Tabla 14.** Concentración de esporas en solución y número aproximado de esporas contenidas en 5 uL de inóculo

<b>Tratamiento</b>	<b>(esporas/mL)</b>	<b># esporas en 5µl</b>
<b>X</b>	$5.6 \times 10^6$	280 000
<b>X<sub>10</sub></b>	$5.6 \times 10^5$	28 000
<b>X<sub>100</sub></b>	$5.6 \times 10^4$	2 800
<b>X<sub>1000</sub></b>	$5.6 \times 10^3$	280
<b>X<sub>10000</sub></b>	$5.6 \times 10^2$	28

### **5.13 Optimización de producción enzimática a través de un diseño de compuesto central (CCD).**

Se desarrolló un diseño experimental de superficie-respuesta del tipo Compuesto Central en el cual se estudiaron 3 factores: Tiempo de fermentación (TF), humedad del sustrato (%) y tiempo de inoculación (TI) de *Paecylomyces formosus*. Las variables de respuesta fueron: Proteína extracelular, actividad de MnP y actividad de lacasa. El orden de las corridas fue aleatorizado (por practicidad las tablas se presentan en orden estándar) y en un solo bloque.

#### **5.13.1 Siembra y condiciones de fermentación.**

*Trametes* sp. y *P. formosus* fueron co-cultivados en cajas Petri de 60x15 mm bajo condiciones SSF. Como sustrato se utilizaron 5g de cáscara de naranja con un tamaño de partícula aproximado de 0.5x0.5cm. El sustrato fue obtenido de un mercado local y fue pre-tratado con una solución de hipoclorito de sodio (0.5%) por 5 horas, posteriormente se lavó con agua bi-destilada y se esterilizó en autoclave durante 20 min (15 psi, 120 °C). El porcentaje de humedad fue ajustado a sus diferentes valores (tabla 15) siguiendo el método reportado por Dwivedi y colaboradores (2011). *Trametes* sp. fue inoculado utilizando 3 discos tomados del micelio en crecimiento. La inoculación con *P. formosus* se realizó a diferentes intervalos de tiempo (Tabla 15) después de la de *Trametes* sp. El volumen de inóculo utilizado fue de 15 µL de una solución de esporas ( $\approx 10^6$  esporas/mL). Los valores de los tres factores se ilustran en la tabla 15.

**Tabla 15.** Valores naturales y codificados. TF = Tiempo de fermentación, TI = Tiempo de inoculación de *Paecylomices* sp.

Factor	Nivel				
	-1	0	+1	1.68	-1.68
Humedad (% v/p)	65	75	85	91.8	58.2
TF (días)	4.5	6	7.5	8.52	3.48
TI (días)	1	2	3	3.68	.32

Para determinar la varianza experimental se establecieron 8 corridas centrales (Tabla 16).

**Tabla 16.** Matriz de diseño con valores codificados.

	Factor		
	Humedad	TF	TI
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	1.68	0	0
10	- 1.68	0	0
11	0	1.68	0
12	0	-1.68	0
13	0	0	1.68
14	0	0	-1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0

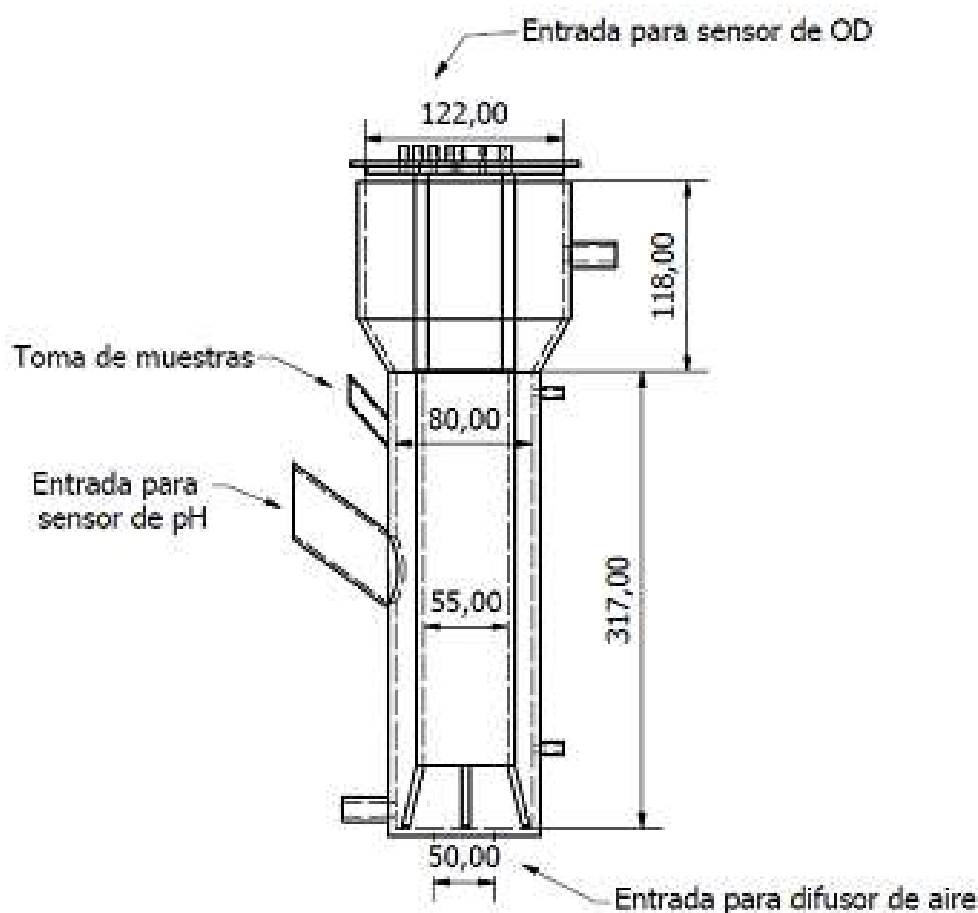
### 5.14 Degradación de endosulfán en un ALB.

El ALB utilizado (figura 3) fue un reactor de circulación interna diseñado por Sarabia (2013). El ALB fue operado a un volumen de trabajo de 2L. Cuenta con una sección de mayor amplitud en la parte superior (separador) que tiene la función de disminuir la velocidad del líquido para permitir que los sólidos fluidizados se precipiten y no sean arrastrados en la corriente de salida cuando se trabaje en un régimen continuo. El separador opera de forma análoga para la separación de gases.

Los parámetros de diseño y características hidrodinámicas del reactor se presentan en la tabla 17.



A)



B)

Figura 3. A) Representación tridimensional ALB. 3) Medidas ALB (mm).

Tabla 17. Parámetros de diseño y características hidrodinámicas ALB (Sarabia, 2013)

Parámetro	Valor
Velocidad superficial del gas	0.663 cm/s
Fracción de gas retenida en el líquido	1.63%
Velocidad de circulación	15.3 cm/s
$k_{La}$	48.6 h <sup>-1</sup>

La operación del ALB se hizo por lotes, cada uno con una duración de 12 días utilizando agua destilada y medio Dwidevi (Tabla 17) como fuente de micronutrientes. El pH inicial se ajustó a un valor de 7 mediante la adición de NaOH 1 M y fue monitoreado diariamente sin ser re-ajustado. La concentración de saturación en el reactor fue establecida como la concentración de oxígeno disuelto

generada por un flujo de aire de 2.1 L min<sup>-1</sup> y fue monitoreada a través de un electrodo de oxígeno disuelto InPro 6000 (Metler Toledo, Suiza). La selección del flujo se basó en el hecho de que un flujo de 2.1 L/min genera la mayor oxigenación en el sistema sin provocar turbulencia (Re < 2100), favoreciendo una correcta circulación de los sólidos y un bajo estrés mecánico dentro del sistema. La concentración de endosulfán en el reactor fue de 5 ppm utilizando Algodán 350 (Bravo AG, México) como fuente del contaminante.

Tabla 18. Composición medio Dwidevi durante pruebas de degradación en ALB.

<b>Componente (Marca, Procedencia)</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (Sigma, E.U.A)	4.2
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> (Sigma, E.U.A)	1.2
<b>MgSO<sub>4</sub></b> (Meyer, México)	0.3
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> (Reasol, México)	0.006
<b>Extracto de levadura</b> (Difco, U.S.A)	0.36
<b>ZnSO<sub>4</sub></b> (Reasol, México)	0.00006
<b>FeSO<sub>4</sub></b> (Merck, México)	0.0003
<b>MnSO<sub>4</sub></b> (Sigma, E.U.A)	0.003

Como inóculo se utilizó el co-cultivo *Trametes sp.* – *Paecilomyces formosus* utilizando cáscara de naranja como sustrato. Las condiciones para la formación del inóculo fueron las condiciones óptimas determinadas a través de un diseño de compuesto central (ver tabla 27) para maximizar la actividad de lacasa. La concentración de sólidos (inóculo) en el reactor fue de 5% (v/v). El tamaño de partícula aproximado de los sólidos fue de 0.125 cm<sup>3</sup> (0.5 x 0.5 x 0.5 cm).

Durante la operación del ALB se realizaron determinaciones diarias de la actividad de lacasa (ver secciones 10.2 y 10.4) y la concentración de endosulfán  $\alpha$ ,  $\beta$  y sulfato de endosulfán (ver sección 10.8).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Ensayos toxicológicos basidiomicetos.

La figura 4 muestra el crecimiento relativo al control de los 6 hongos que exhibieron mayor tolerancia a endosulfán. En todos los organismos evaluados la tasa de crecimiento disminuyó conforme aumentó la concentración de endosulfán en el medio. Las cepas que no se presentan en la gráfica presentaron un crecimiento relativo inferior al 10% y fueron descartadas para posteriores estudios.

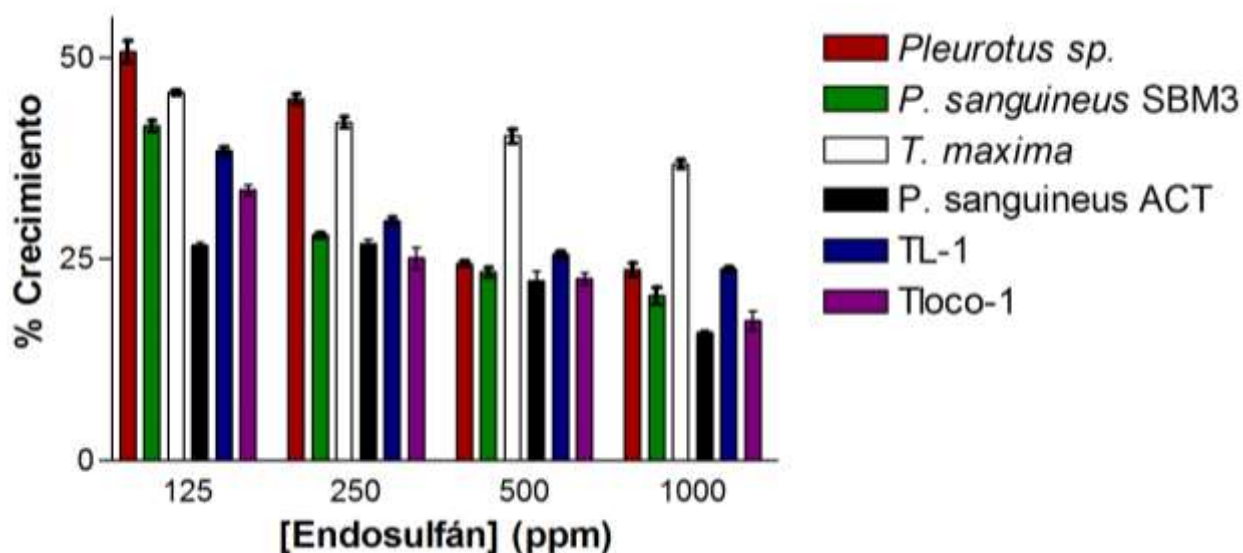


Figura 4. Crecimiento relativo. \*Barras de error representan el error estándar de la media.

A una concentración de 125 ppm de endosulfán, *Pleurotus sp.* mostró un crecimiento relativo de 50%, el cual fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) al del resto de las cepas evaluadas. A una concentración de 1000 ppm, *T. maxima* ostentó un crecimiento relativo de 37%, siendo significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que el de las otras cepas evaluadas. Los resultados obtenidos en los bioensayos exhiben la alta toxicidad del endosulfán sobre las cepas estudiadas, lo que se ve reflejado en



crecimientos relativos  $\leq 50\%$  incluso para la concentración de trabajo más baja (125 ppm). De igual manera, se observó que el umbral de tolerancia varía en cada cepa estudiada.

En la figura 5 se ilustran las tasas medias de crecimiento de las 6 cepas de basidiomicetos más tolerantes.

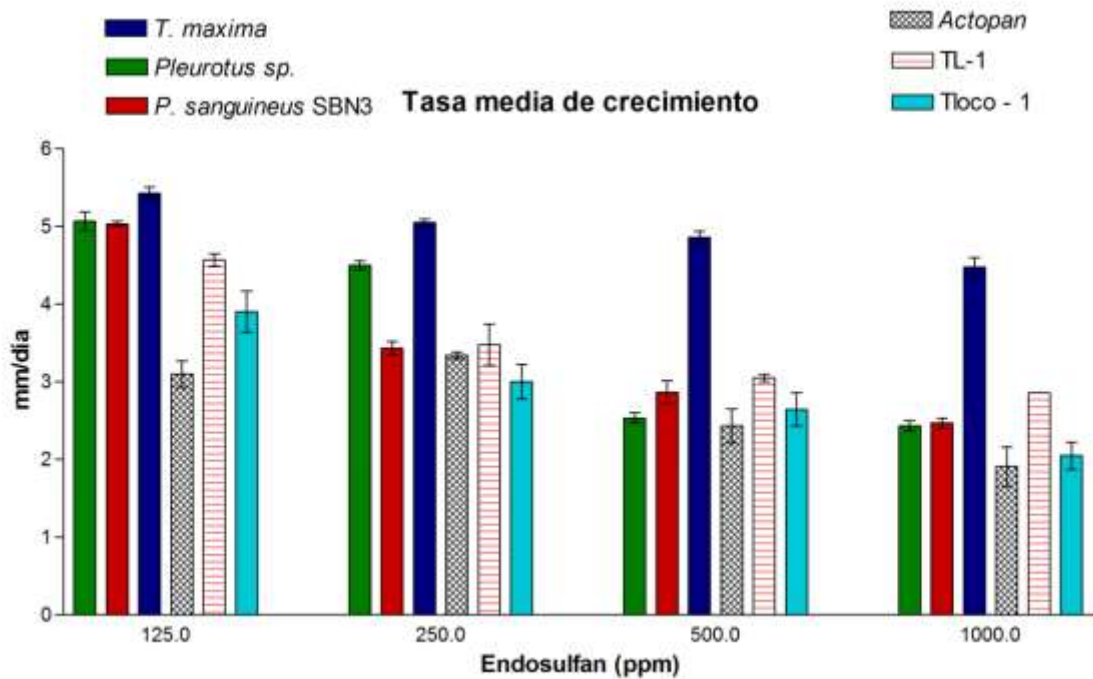


Figura 5. Tasa media de crecimiento (mm/día).

Se observa que la cepa que mostró una velocidad de crecimiento significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en todas las concentraciones de endosulfán fue *T. maxima*, cuya tasa de crecimiento disminuyó tan solo 0.9 mm/día entre la concentración más baja (125 ppm) y la más alta (1000 ppm).

En la tabla 19 se presentan los valores obtenidos mediante el análisis Probit para las 6 cepas estudiadas.

**Tabla 19.** Resultados análisis Probit basidiomicetos.

<b>Cepa</b>	<b>CE<sub>50</sub> (ppm)</b>	<b>IC</b>	<b>P&gt;χ<sup>2</sup></b>
<i>Pleurotus</i> sp.	193.2	147.3-236.5	<0.0001
<i>P. sanguineus</i> SBM3	59.8	21.9-99.3	<0.0001
<i>T. máxima</i>	74.8	0.05–177.0	0.0188
TL-1	37.45	1.71-90.9	0.0007
<i>P. sanguineus</i> ACT	12.81	0.17-44.2	0.0006
Tloco-1	5.18	0.01-28.56	0.0029

IC = intervalo de confianza para  $\alpha=0.05$ ,

CE<sub>50</sub> = Concentración efectiva media: concentración a la cual se inhibe el crecimiento del organismo en un 50%.

Los organismos que presentaron las CE<sub>50</sub> más elevadas fueron las cepas *Pleurotus* sp., *T. maxima* y *P. sanguineus* SBM3. Sin embargo, solo *Pleurotus* sp. fue significativamente diferente al resto de las cepas evaluadas, de acuerdo al traslape de los intervalos de confianza. Los valores de probabilidad asociada al valor del estadístico  $\chi^2$  fueron inferiores a 0.05, lo que indica la validez del modelo de regresión para cada caso.

En cuanto a la actividad enzimática, el gráfico de la figura 6 ilustra los perfiles de actividad de lacasa de las distintas cepas evaluadas. La presencia de endosulfán promovió un aumento significativo ( $P<0.01$ ) en la actividad de la enzima para todas las cepas, con respecto al control, con la excepción de *Pleurotus* sp. Los incrementos en la actividad de lacasa oscilaron entre 15 hasta 67 veces más que el tratamiento control entre los distintos hongos y concentraciones de endosulfán estudiados.

El aumento en la actividad de lacasa extracelular de diversos hongos en condiciones de estrés químico y/o biológico ha sido reportado anteriormente (Vladimir *et al.*, 2010).

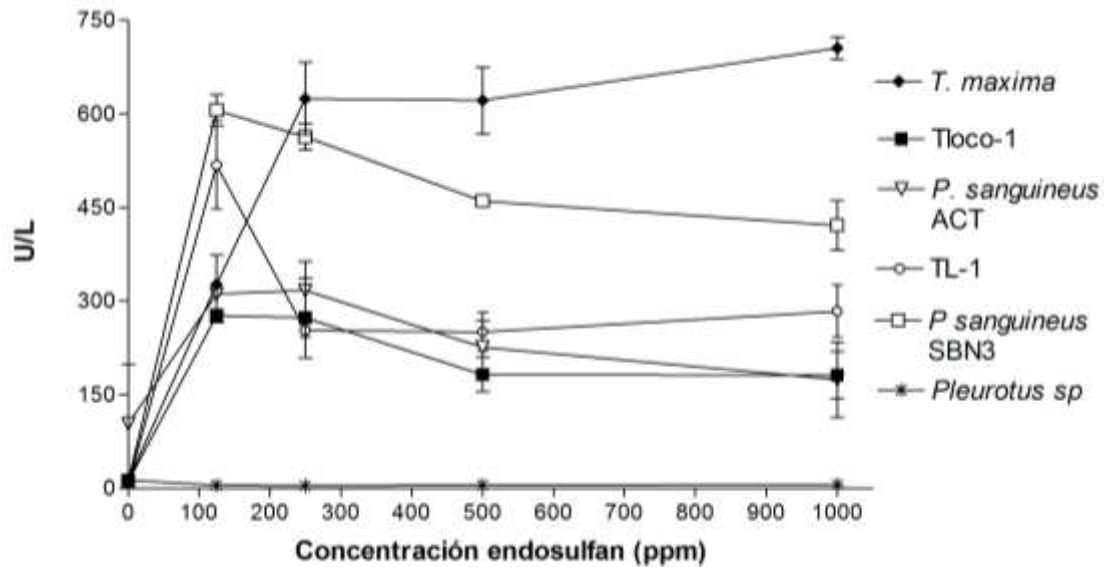


Figura 6. Perfiles de actividad de lacasa a diferentes concentraciones de endosulfán.

El hongo *Trametes maxima* fue el único organismo que no presentó una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en la actividad de lacasa conforme aumentó la concentración de endosulfán a partir de 125 ppm, mientras para el resto de las cepas, se advierte un decremento significativo ( $P < 0.05$ ) a partir de la de las 125 ppm de endosulfán. De manera interesante, la producción de lacasa por *Pleurotus* sp. no aumentó por la presencia de endosulfán. Según los estudios de Kullman y Matsumura (1996) la biodegradación de endosulfán puede llevarse a cabo mediante rutas hidrolíticas y oxidativas; en base a esto, los resultados obtenidos sugieren que *Pleurotus* sp. utilizó un mecanismo primordialmente hidrolítico para la transformación de endosulfán.

Todos los hongos, a excepción de *Pleurotus* sp., exhibieron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la producción de MnP en presencia de endosulfán (figura 7). De manera similar, la actividad enzimática disminuyó significativamente a partir de una concentración de 250 ppm. Es importante mencionar que *T. maxima* fue la cepa con mayor crecimiento a concentraciones superiores a 500 ppm y la que mostró una

producción significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) de MnP a concentraciones de endosulfán mayores a 250 ppm.

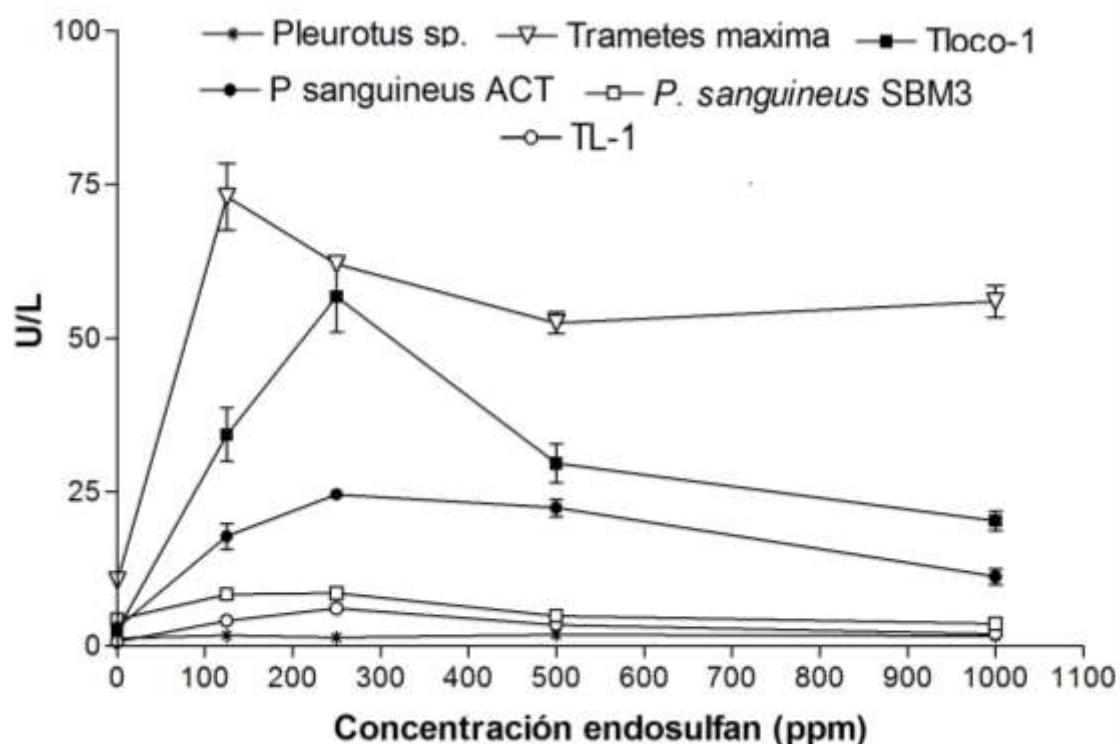


Figura 7. Perfiles de actividad de MnP a diferentes concentraciones de endosulfán.

### 6.1.2 Ensayos toxicológicos micromicetos.

Las cepas analizadas mostraron gran variación con respecto a los niveles de tolerancia a endosulfán y las tasas de crecimiento exhibidas a las diferentes concentraciones de trabajo. En la tabla 20 se presentan los valores obtenidos mediante los análisis “probit” para las diferentes estudiadas.

Tabla 20. Resultados análisis Probit en micromicetos

Cepa	CE <sub>50</sub> (ppm)	IC	P>χ <sup>2</sup>
<i>P. formosus</i> .	142.6	57 -217	<0.0001
ID-2.	235.7	99 -370	0.0008
ID-3.	246	57 -446	0.0078
<i>P. carneus</i>	463	277 - 2642	0.0338
<i>Aspergillus</i> sp.	625	401 - 1646	0.0005
<i>A. tamarii</i>	498	355 - 825	<0.0001
<i>P. pinophilum</i>	226.2	121.5 - 319	<0.0001

IC = intervalo de confianza para  $\alpha=0.05$

CE<sub>50</sub> = concentración efectiva media

Las cepas ID-4, ID-5 presentaron valores de CE<sub>50</sub> inferiores a 5 ppm y fueron descartadas para posteriores estudios. El ajuste del análisis probit para la cepa *Trichoderma* sp. no fue significativo ( $P > 0.05$ ) por lo que no fue posible determinar la CE<sub>50</sub>.

Para los ascomicetos estudiados, los valores CE<sub>50</sub> obtenidos oscilaron entre 142.6 y 625 ppm, esto muestra que, en general, los micromicetos de este estudio son más tolerantes al endosulfán que los basidiomicetos, cuyos valores de CE<sub>50</sub> oscilaron entre 5.18 y 193.2 ppm.

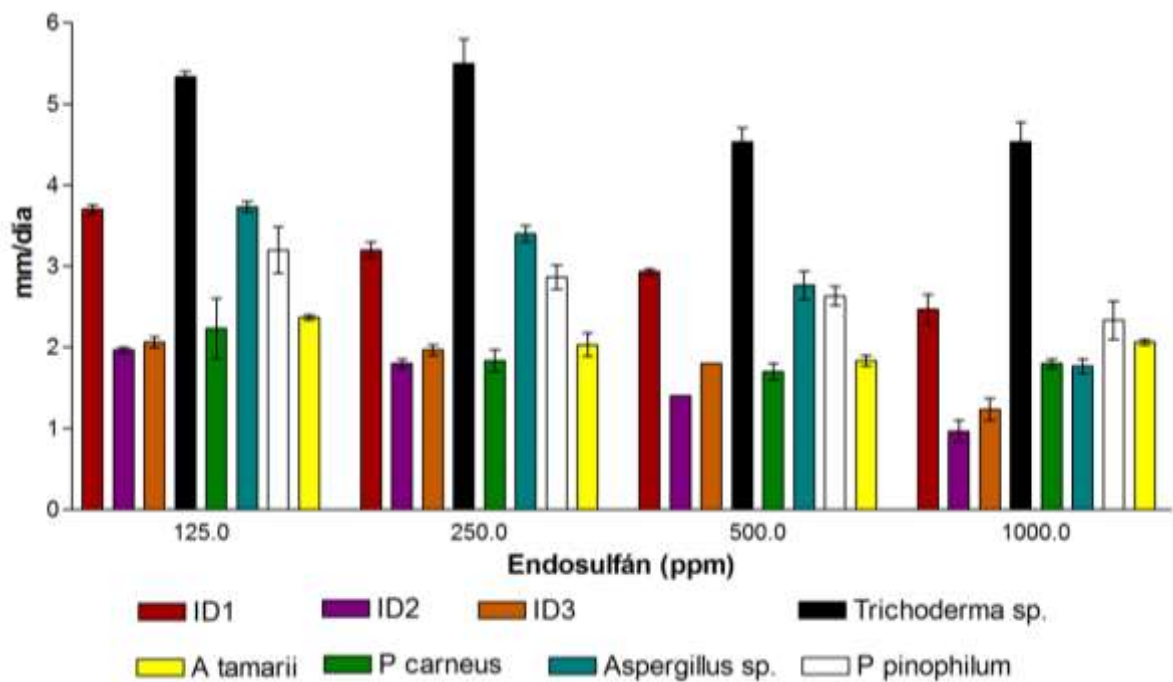


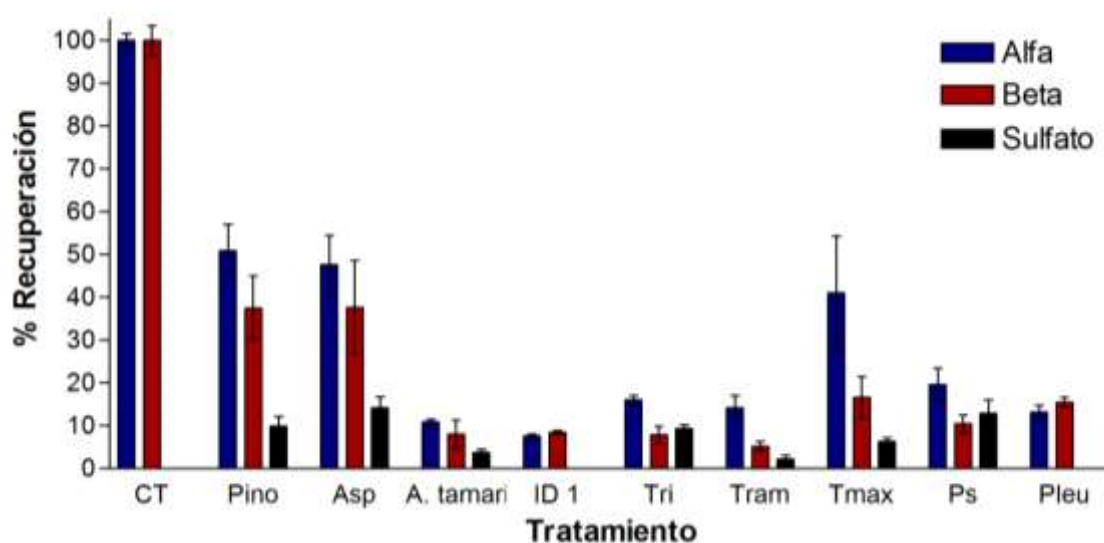
Figura 8. Tasas medias de crecimiento de los micromicetos. ID1= *P. formosus*

En la figura 8 se aprecian las tasas medias de crecimiento que presentaron los micromicetos estudiados. La cepa que presentó la tasa de crecimiento significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en todas las concentraciones de endosulfán fue

*Trichoderma* sp. De forma interesante, las tasas medias de crecimiento de los micromicetos fueron en general menores a las de los hongos de pudrición blanca, demostrando que una mayor tolerancia no es estrictamente proporcional a una mayor velocidad de crecimiento.

## 6.2 Pruebas de degradación en cultivo líquido por lote

Los porcentajes de recuperación de los tratamientos control (biomasa inerte) y los tratamientos blanco (sin biomasa) fueron similares, con coeficientes de variación menores al 8%, estos resultados sugieren que la remoción de endosulfán por mecanismos de sorción es poco significativa y a su vez, corrobora lo reportado anteriormente por Kamei y colaboradores (2011), donde la remoción por mecanismos de adsorción fue inferior al 5%.



**Figura 9.** Porcentajes de recuperación de  $\alpha$  y  $\beta$  endosulfán y sulfato de endosulfán. CT= Control; ID1= *P. formosus*; Pino = *P. pinophilum*; Asp= *Aspergillus* sp.; Tri= *Trichoderma* sp.; Tram: *Trametes* sp. Ps = *P. sanguineus*; Tmax= *T. maxima*; Pleu= *Pleurotus* sp.

A pesar de que en todos los tratamientos exhibieron remoción de endosulfán, sólo las cepas *P. formosus*, *A. tamar*, *Trametes* sp. y *Pleurotus* sp. alcanzaron una remoción mayor al 80% de ambos isómeros (Tabla 19). De los cuatro tratamientos

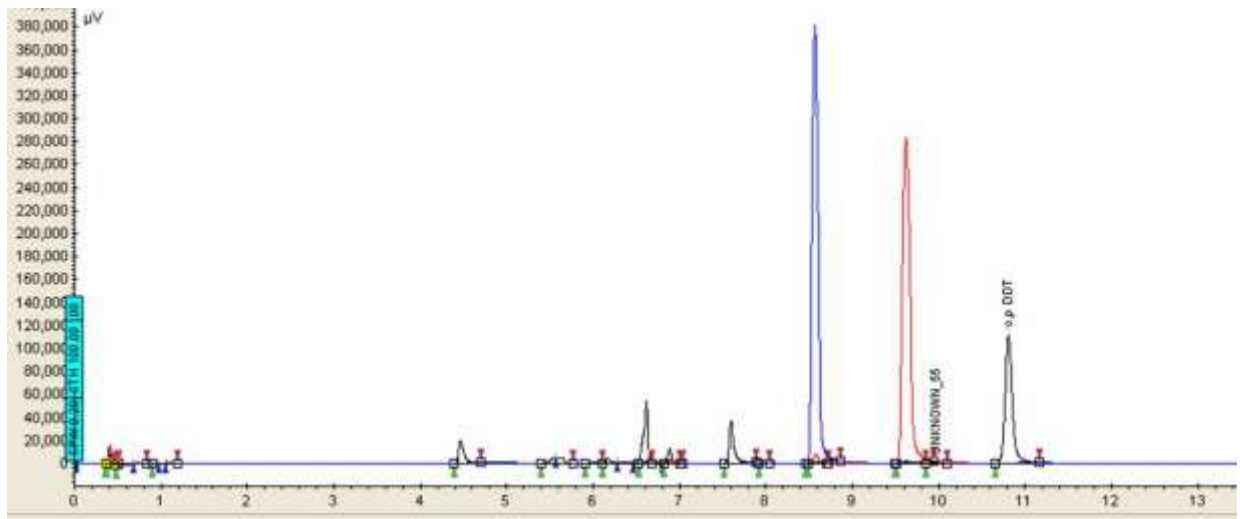
mencionados, se detectaron porcentajes de formación de endosulfán sulfato en los tratamientos *A. tamarii* y *Trametes* sp. con valores de  $3.73 \pm 0.8\%$  y  $2.7 \pm 1.6\%$  respectivamente (Figura 9).

**Tabla 21.** Remoción de endosulfán en pruebas de degradación

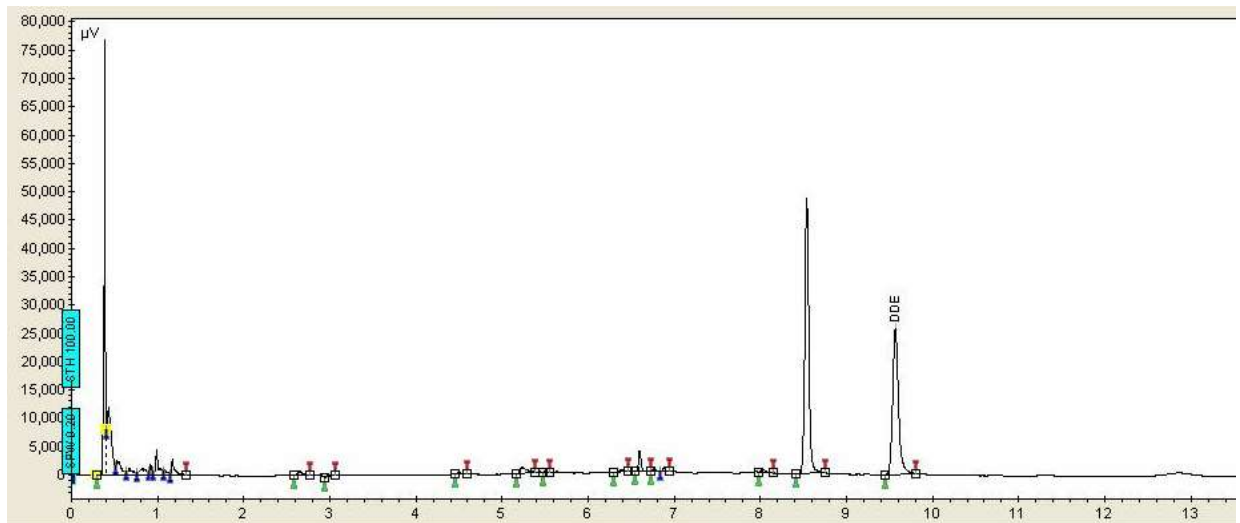
<b>Tratamiento</b>	<b>Remoción <math>\alpha</math></b>	<b>Remoción <math>\beta</math></b>
<b><i>P. formosus</i></b>	$92.41 \pm 0.8 \%$ (a, b)	$91.48 \pm 0.7\%$ (a)
<b><i>A. tamarii</i></b>	$89.48 \pm 1.1 \%$ (b, c)	$89.77 \pm 6.4\%$ (a, b)
<b><i>Pleurotus</i> sp.</b>	$86.81 \pm 2.68 \%$ (c)	$84.44 \pm 1.79 \%$ (b)
<b><i>Trametes</i> sp.</b>	$85.82 \pm 5.1 \%$ (c)	$94.8 \pm 1.9 \%$ (a)

Literales diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en una prueba LSD de Fisher.

De manera interesante, en los tratamientos *P. formosus* y *Pleurotus* sp. no se detectó presencia de sulfato de endosulfán en el medio (Figuras 10, 11 y 12). En estudios de biodegradación de endosulfán en medio líquido utilizando *A. niger* se observó la formación de sulfato de endosulfán después de 90 horas de tratamiento (Bhalerao y Puranik, 2007). A su vez, se ha reportado la biorremediación de suelo y agua con endosulfán por la cepa *A. tamarii* JAS9, detectando sulfato de endosulfán como metabolito principal durante los primeros 9 días de tratamiento, sin embargo, éste logró ser transformado posteriormente por la misma cepa hasta niveles no detectables después de 20 días de tratamiento (Silamabaran, 2013); Los autores proponen que lo anterior podría ocurrir debido a la capacidad del hongo para utilizar el sulfato de endosulfán como fuente de carbono y/o azufre, una vez que escasean en el medio alguno de estos nutrientes. La nula y muy baja producción de enzimas ligninolíticas por parte de *P. formosus* y *Pleurotus* sp. respectivamente (ver sección 11.2.1) parece indicar que dichos hongos emplean preferentemente rutas hidrolíticas para la transformación del endosulfán (Matsumura, 1996), o bien, son capaces de realizar oxidaciones posteriores de dicho metabolito en las que no intervienen enzimas ligninolíticas y posteriormente son capaces de asimilarlo como fuente de carbono o azufre.



**Figura 10.** Cromatogramas que muestran los tiempos de retención (minutos) de los estándares de  $\alpha$ -endosulfán (Azul),  $\beta$ -endosulfán (Rojo) y endosulfán sulfato (Negro).



**Figura 11.** Cromatograma tratamiento *P. formosus*



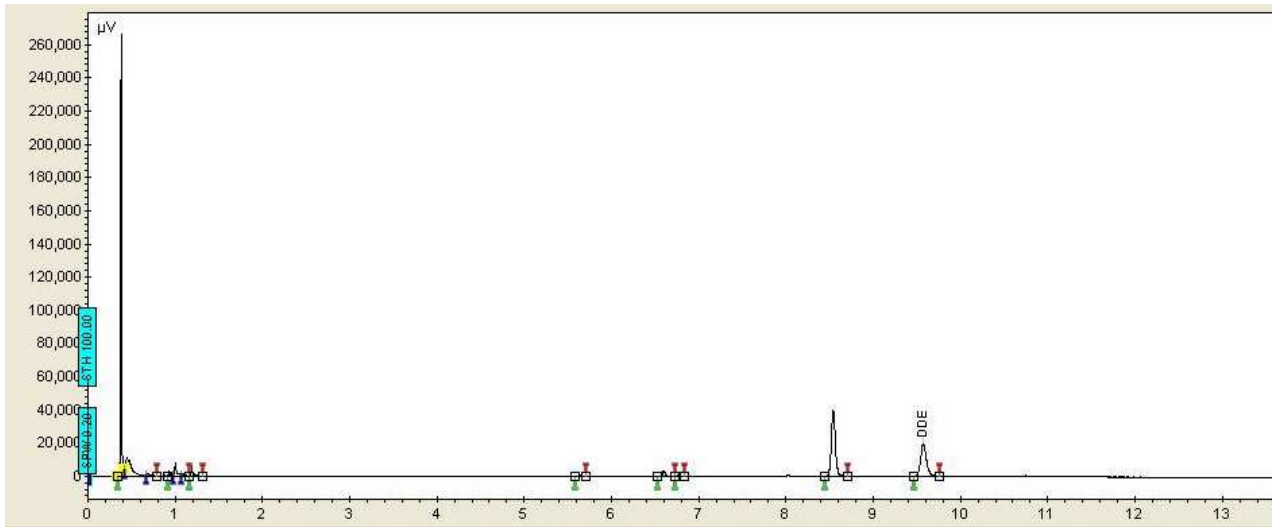


Figura 12. Cromatograma tratamiento *Pleurotus sp.*

### 6.2.1 Actividad enzimática en pruebas de degradación en medio líquido

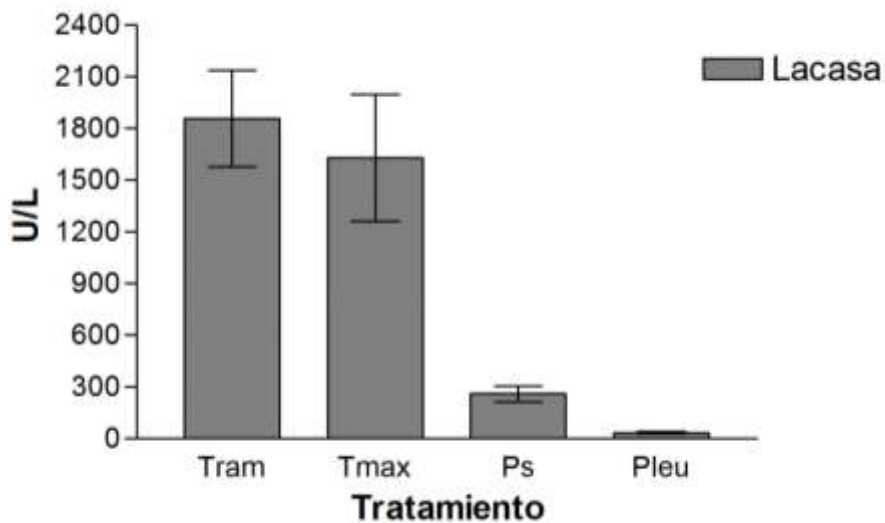
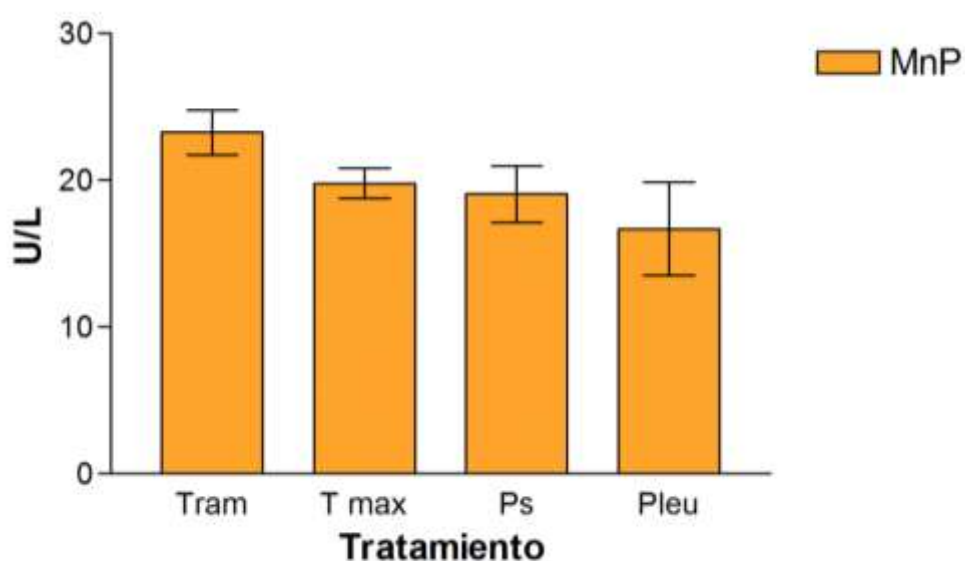


Figura 13. Actividad de lacasa pruebas de degradación en medio líquido por lote

A pesar de que existen reportes de ascomicetos capaces de producir lacasas (Fortina *et al.*, 1996, Vasconcelos, 2000, Wang *et al.*, 2005), ésta característica es poco común en dichos organismos, como se pudo corroborar a través de nuestros datos experimentales los cuales solo mostraron actividad por parte de los basidiomicetos (Figura 13). Al finalizar los 12 días de incubación los tratamientos

*Trametes* sp. ( $1855 \pm 355$  U/L) y *Trametes maxima* ( $1628 \pm 281$  U/L) fueron los que presentaron una mayor actividad de Lacasa, esto concuerda con diversos estudios que han demostrado que los hongos del género *Trametes* se caracterizan por producir mayor cantidad de esta enzima que otros géneros como *Phanerochaete*, *Pycnoporus* o *Pleurotus* (Minussi et al., 2002; Xu, 2005). El tratamiento *P. sanguineus* muestra una actividad moderada ( $258 \pm 72.1$  U/L) y el tratamiento *Pleurotus* sp. presentó actividades de lacasa relativamente bajas ( $36 \pm 7.6$  U/L).



**Figura 14.** Actividad de MnP pruebas de degradación en medio líquido por lote

En el caso de la enzima manganeso peroxidasa, todos los basidiomicetos presentaron actividades similares al finalizar los 12 días de incubación (Figura 13), el análisis de varianza no mostró diferencia estadísticamente significativa entre ningún tratamiento ( $P > 0.05$ ).

### 6.3 Ensayo de compatibilidad de co-cultivos.

La compatibilidad de hongos pertenecientes a diferente *Phylum* fue evaluada. Las características más deseables en un co-cultivo fúngico son la capacidad para coexistir en el mismo medio, generando y/o aumentando la producción de metabolitos o compuestos de interés. Las figuras 9, 10, 11 y 12 muestran las placas Petri de los diferentes co-cultivos estudiados.

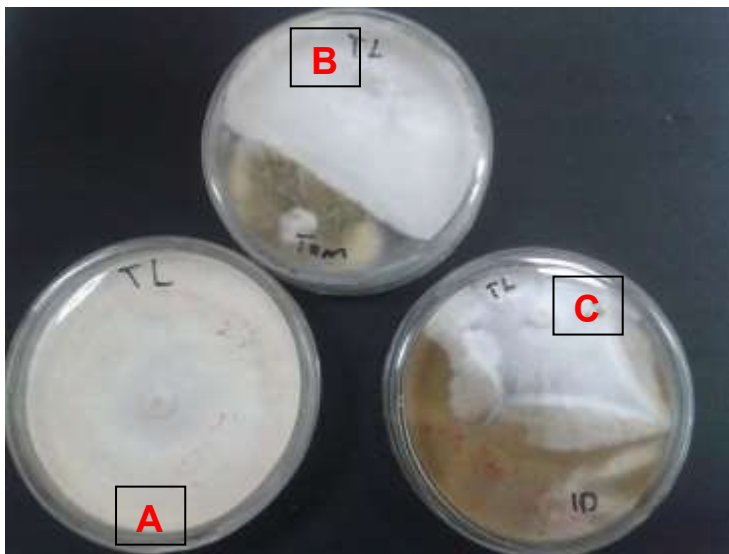


Figura 15. A) *Trametes* sp. B) Co-cultivo *Trametes* sp. / *A. tamaritii* C) Co-cultivo *Trametes* sp. / *P. formosus*

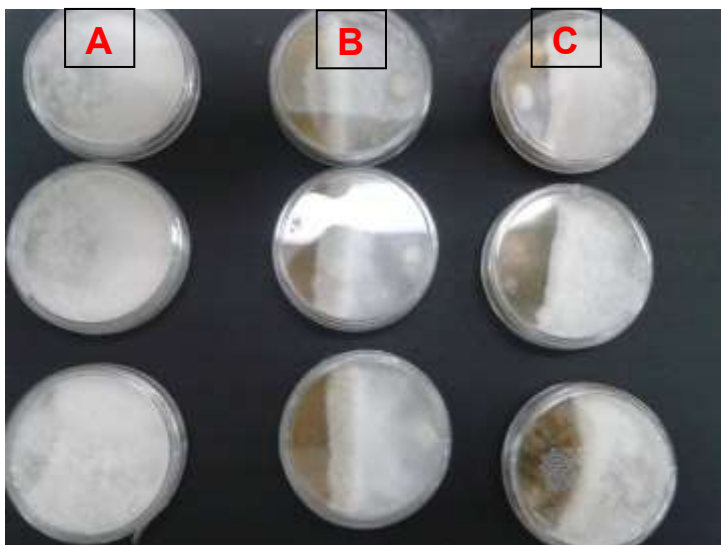
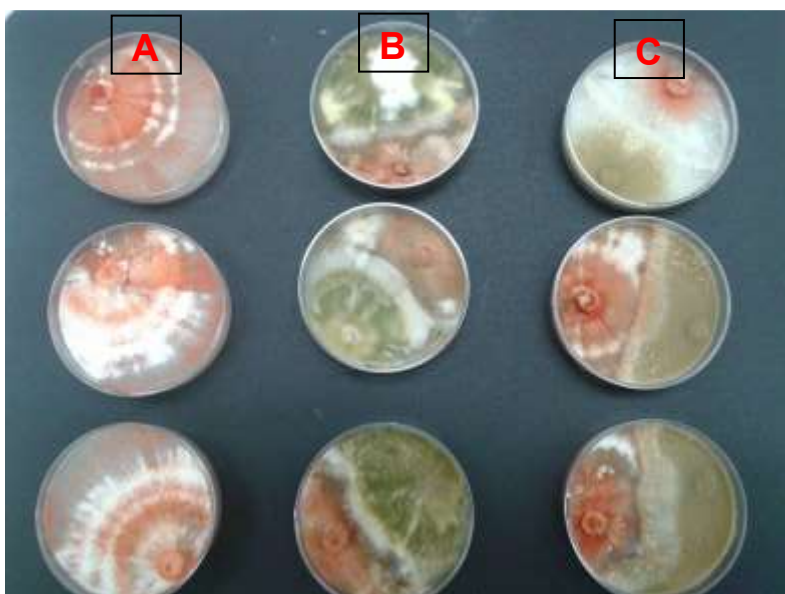


Figura 16. Columnas: A) *T. maxima* B) Co-cultivo *T. maxima* / *P. formosus* C) Co-cultivo *T. maxima* / *A. tamaritii*



**Figura 17.** Columnas: A) *P. sanguineus* B) Co-cultivo *P. sanguineus* / *A. tamarii* C) Co-cultivo *P. sanguineus* / *P. formosus*

Los distintos co-cultivos analizados presentaron interacciones específicas diferentes, presentándose reacciones de antagonismo de distinta magnitud. En todos los co-cultivos se presentó inhibición inicial por contacto, produciéndose, en algunos casos, un reemplazo parcial o total por parte del basidiomiceto o del micromiceto. En la tabla 20 se detallan el tipo de interacción específica de cada co-cultivo así como el índice de antagonismo obtenido para cada organismo.

**Tabla 22.** Interacciones entre basidiomicetos y micromicetos cultivados en PDA

Organismo	<i>P. formosus</i>	<i>Aspergillus tamarii</i>	Índice de antagonismo (IA)
<i>Trametes</i> sp.	CA1	CA2	8
<i>T. maxima</i>	CA2	CA2	9
<i>P. sanguineus</i>	CA1	CA1 *	3.5
<i>Pleurotus</i> sp.	A	A	2
<b>Índice de antagonismo</b>	1	4.5	-

CA1 = Reemplazo parcial con inhibición inicial por contacto, CA2= Reemplazo total con inhibición inicial por contacto, A= Inhibición mutua con contacto entre micelios. \* El micromiceto reemplazó al basidiomiceto.

*T. maxima* y *Trametes* sp. exhibieron dominio sobre los micromicetos con los que fueron co-cultivados, obteniendo un IA de 9 y 8 respectivamente, el cual según la clasificación propuesta por Badalyan (2004) los cataloga como altamente agresivos.

*Pleurotus* sp. presentó buenas características de compatibilidad con *P. formosus* y *A. tamaraii* ya que en ambos casos ninguno de los dos hongos reemplaza al otro. *Trametes* sp. mostró una compatibilidad aceptable con ambos micromicetos ya que, a pesar de haber un reemplazo durante las primeras horas de contacto, la invasión de *Trametes* sp. cesó y como resultado ambos hongos lograron co-existir en el mismo medio. *Pycnoporus sanguineus* obtuvo un IA de 3.5, catalogándose como moderadamente agresivo ya que desplazó a *P. formosus* pero fue totalmente desplazado por el rápido crecimiento de *A. tamaraii*.

#### 6.4. Actividad enzimática en ensayos de compatibilidad en co-cultivos.

Tabla 23. Producción de lacasa en co-cultivos de Basidiomicetos/ Micromicetos

Cultivo	Actividad (U/L)	Orden de incremento (Veces con respecto al control)
<i>T. maxima</i>	60.1 ± 19.1	-
<i>T. maxima/ P. formosus</i>	<b>149.3 ± 53.2</b>	1.4
<i>T. maxima/ A. tamaraii</i>	<b>287 ± 74.87</b>	3.8
<i>P. sanguineus</i>	6.3 ± 0.94	-
<i>P. sanguineus/ P. formosus</i>	<b>45.5 ± 10</b>	6.2
<i>P. sanguineus/ A. tamaraii</i>	<b>29.1 ± 5.51</b>	3.6
<i>Trametes</i> sp.	37.8 ± 2.2	-
<i>Trametes</i> sp./ <i>P. formosus</i>	60.5 ± 22.8	-
<i>Trametes</i> sp./ <i>A. tamaraii</i>	<b>56.6 ± 1.2</b>	0.5
<i>Pleurotus</i> sp.	56.2	-
<i>Pleurotus</i> sp. / <i>P. formosus</i>	<b>143.3 ± 31.1</b>	1.5
<i>Pleurotus</i> sp. / <i>A. tamaraii</i>	<b>147.7 ± 31.2</b>	1.6

La presencia de los micromicetos *P. formosus* y *A. tamaraii* en cultivos de *T. maxima* y *P. sanguineus* favoreció la producción de lacasa, llegando a registrarse la mayor actividad en el co-cultivo *T. maxima / A. tamaraii* (287 ± 74.87 U/L) y el mayor orden de incremento lo presentó el co- cultivo *P. sanguineus / P. formosus* (6.2 veces con respecto al control). Diversos autores han estudiado la inducción de lacasa debido al cultivo simultáneo de hongos ligninolíticos con diferentes organismos. Baldrian

(2004) investigó el efecto en la actividad de lacasa de *T. versicolor* al ser cultivado simultáneamente con bacterias, levaduras y microorganismos de suelos, concluyendo que si bien estos organismos pueden incrementar la producción de lacasa, de manera general, esta inducción es menor que cuando se utilizaron co-cultivos con hongos filamentosos. Los órdenes de incremento en la actividad de lacasa de *T. versicolor* oscilaron entre 1.4 y 49 veces con respecto al control, con la mayor actividad reportada =  $223.2 \pm 45.1$  U/L.

**Tabla 24.** Actividad de MnP en ensayos de compatibilidad de co-cultivos.

<b>Cultivo</b>	<b>Actividad (U/L)</b>	<b>Orden de incremento (Veces con respecto al control)</b>
<b>Tmax</b>	ND	-
<b>Tmax/ ID-1</b>	$1 \pm 0.9$	-
<b>Tmax/ <i>A. tamaritii</i></b>	$2.4 \pm 0.01$	-
<b>Ps</b>	$17.1 \pm 3.2$	-
<b>Ps/ ID-1</b>	$2.1 \pm 1.25$	-8.14
<b>Ps/ <i>A. tamaritii</i></b>	$1.8 \pm 0.2$	-12.21
<b>Tram sp.</b>	ND	-
<b>Tram sp./ ID-1</b>	ND	-
<b>Tram sp./ <i>A. tamaritii</i></b>	ND	-
<b>Pleu</b>	ND	-
<b>Pleu / ID-1</b>	ND	-
<b>Pleu / <i>A. tamaritii</i></b>	ND	-

La actividad de MnP (Tabla 22) en el tratamiento *T. maxima* aumentó en ambos co-cultivos, sin embargo, los niveles máximos de actividad registrados ( $2.4+0.01$  U/L) fueron bajos. De manera interesante, la actividad de MnP en *P. sanguineus* se vio reducida de manera importante (hasta 12 veces) cuando este hongo creció en co-cultivo. Estos datos sugieren, una vez más, que las respuestas enzimáticas en co-cultivos pueden ser altamente dependientes de los organismos que interaccionan en dichas relaciones ecológicas (Velázquez-Cedeño et al., 2007).

## 6.5 SSF de co-cultivos: Selección de tipo de sustrato y tiempo de fermentación

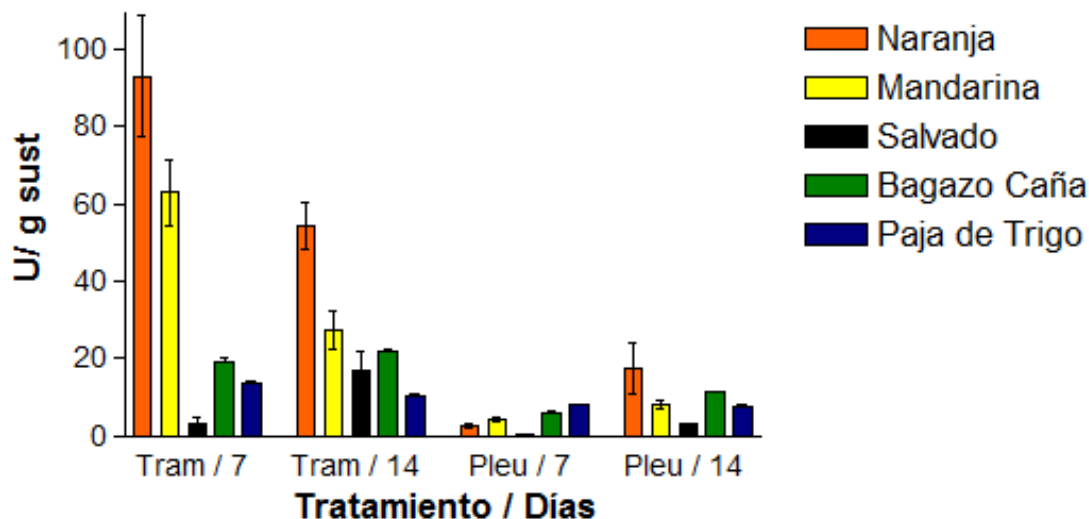
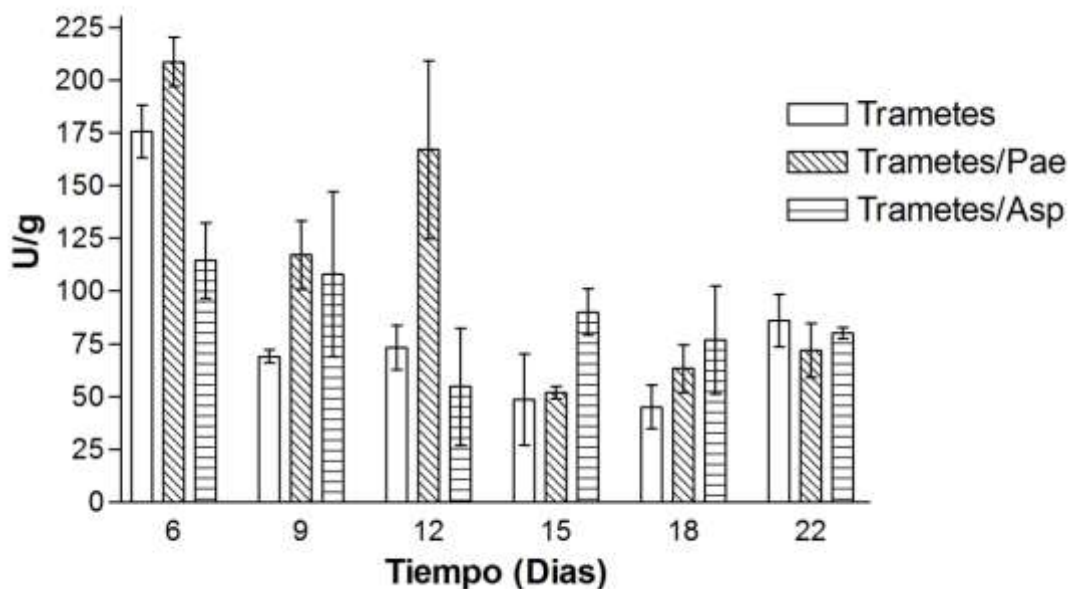


Figura 18. Actividad de lacasa en SSF de *Trametes sp.* (Tram) y *Pleurotus sp.* (Pleu) en diferentes sustratos.

Se realizaron fermentaciones en 5 sustratos sólidos (SSF) con las cepas *Trametes sp.* y *Pleurotus sp.* y se cuantificó la actividad de lacasa a los días 7 y 14 de fermentación. El hongo *Trametes sp.* exhibió mayor actividad de lacasa en el día 7 cuando se cultivó en cáscara de naranja, cáscara de mandarina y paja de trigo y dicha actividad disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en el día 14 mientras que al ser cultivado en bagazo de caña y salvado de trigo, la actividad fue significativamente mayor en el día 14 que en el 7. El hongo *Pleurotus sp.* exhibió una velocidad de crecimiento lenta en todos los sustratos y se detectó una actividad de lacasa considerablemente más baja que la observada en *Trametes sp.*

A partir de estos resultados, se optó por continuar los futuros trabajos con la cepa *Trametes sp.* y con la cáscara de naranja y de mandarina como sustratos. Después de seleccionar los sustratos ideales y el basidiomiceto que presentó un mejor

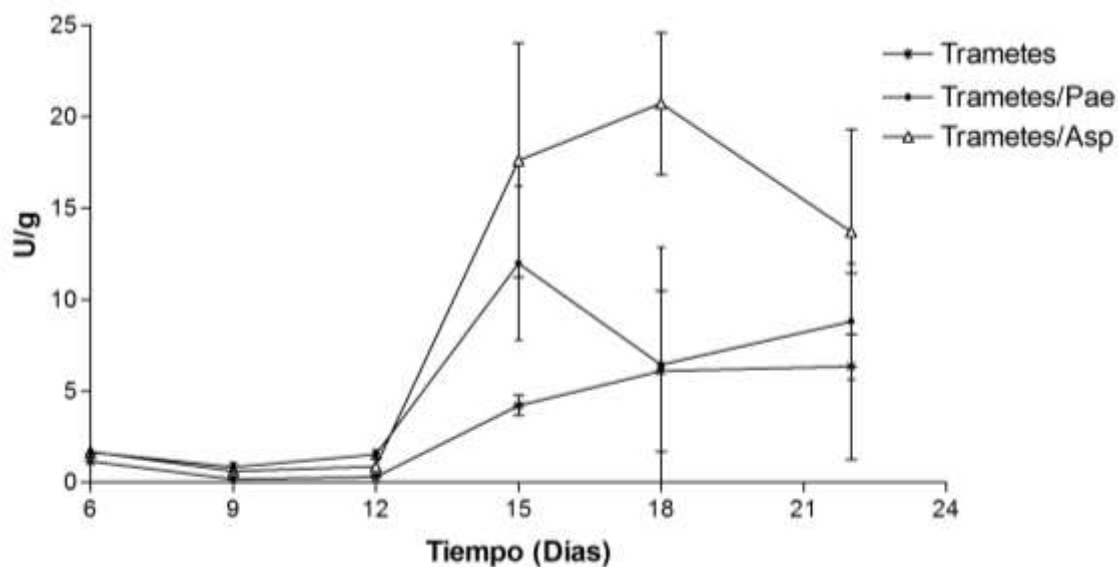
crecimiento y una mayor actividad enzimática se procedió a determinar el tiempo idóneo de fermentación así como el perfil de actividades enzimáticas en co-cultivos.



**Figura 19.** Actividad de lacasa en cáscara de naranja como sustrato. Pae = *P. formosus* Asp= *A. tamarii*.

La actividad de lacasa (figura 19) en todas las cepas presentó una tendencia a disminuir con el transcurso del tiempo, este comportamiento resulta esperable ya que al irse consumiendo el sustrato, la concentración de componentes fenólicos, dímeros de lignina y compuestos aromáticos capaces de inducir la producción de lacasa también disminuyen. La mayor actividad ( $210 \pm 12$  U/g) la registró el co-cultivo *Trametes sp.* – *P. formosus* a los 6 días de incubación y se mantuvieron niveles de actividad superiores a 100 U/g hasta al menos 12 días. A partir del día 15 de incubación la actividad de los tres tratamientos no varió de manera importante.



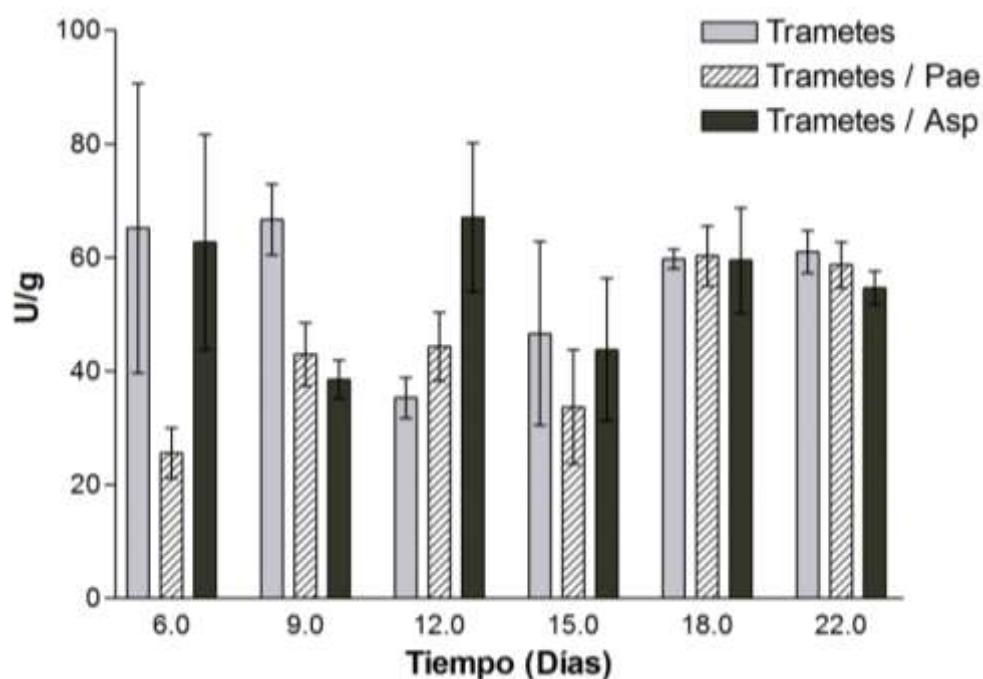


**Figura 20.** Actividad de MnP en cáscara de naranja como sustrato. Pae = *P. formosus* Asp= *A. tamaritii*.

La actividad de MnP (figura 20) no varió de manera considerable con ninguna de las cepas sino hasta después de 12 días de incubación, en donde se detectó un incremento significativo en la actividad de todos los tratamientos, los mayores incrementos se registraron en los co-cultivos y la actividad de los mismos fue significativamente mayor a la del monocultivo de *Trametes sp.* La mayor actividad se registró el día 18 ( $21 \pm 4.3$  U/g) en el co-cultivo *Trametes sp.* – *A. tamaritii* y fue significativamente mayor al del resto de los tratamientos en un orden de 2 – 4 veces.

Un aumento considerable (2.6 veces) en la expresión genética de MnP en *P. chrysosporium* fue observada después de la adición de  $Mn^{+2}$  y  $H_2O_2$  al medio. Este aumento fue significativamente mayor al inducido por la sola presencia de  $H_2O_2$  o  $Mn^{+2}$  (Li *et al.*, 1995). El incremento en la actividad de MnP a partir del día 12 puede estar relacionado con la accesibilidad a diversos ácidos orgánicos, los cuales pueden haber causado un estrés en los hongos al disminuir el pH, además de actuar como agentes quelantes en la estabilización del  $Mn^{+3}$ , pueden ser descompuestos

por el hongo para producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un ejemplo de este tipo de reacciones es la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vía oxalato oxidasa en hongos, la cual ha sido reportada por diversos autores (Hermann *et al.*, 1983; Aguilar *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2000; Opaleye *et al.*, 2006). El ácido oxálico es uno de los ácidos orgánicos predominantes en la cáscara de naranja. Ersus y Cam (2007) reportaron que el ácido oxálico contenido en la cáscara de *Citrus aurantium* (naranja agria) representa el 54% (257.5±25.3 mg/100g cáscara) del total de ácidos orgánicos.



**Figura 21.** Actividad de lacasa con cáscara de mandarina como sustrato.

Los niveles de actividad de lacasa en cáscara de mandarina (figura 21) fueron menores a los detectados en cáscara de naranja. La razón probable de esta variación podría estar relacionada con la diferencia en los compuestos fenólicos totales (CFT) de cada sustrato. A partir de un análisis de literatura científica, se identificaron reportes para CFT en ambos sustratos, obteniéndose que en promedio la cáscara de mandarina tiene un nivel de CFT= 383.3 mg/100g (Zhang *et al.*, 2014;

Li *et al.*, 2006) mientras que en cáscara de naranja el nivel de CFT = 487.1 mg/100g (Ersus y Cam, 2007).

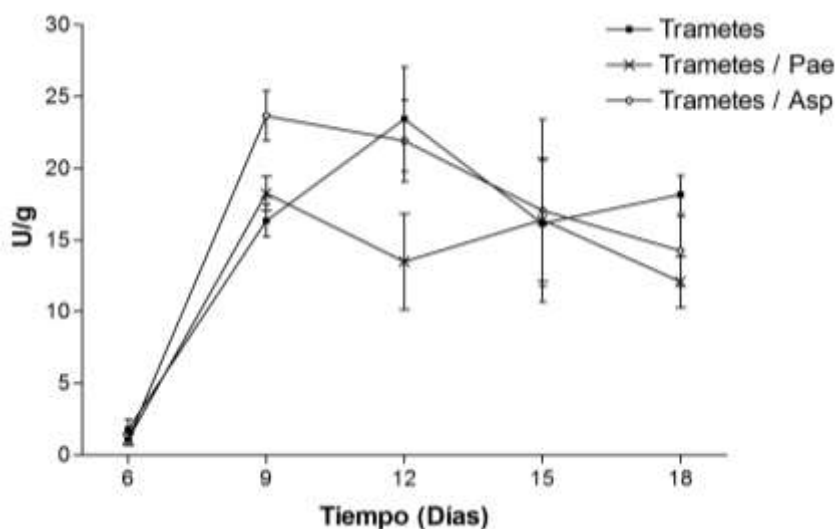


Figura 22. Actividad de MnP en cáscara de mandarina como sustrato

Con respecto a la actividad de MnP, la actividad en el día 6 fue mínima, detectándose actividad significativa hasta el día 12 de fermentación. El co-cultivo *Trametes sp. / A. tamaritii* presentó una mayor actividad de MnP con respecto al mono cultivo en el 9no día de fermentación, sin embargo, a partir del día 12, no se observaron diferencias significativas entre el mono cultivo y los co-cultivos. Estos datos, y los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* indican que la producción de MnP por parte de los basidiomicetos estudiados no aumenta debido a la presencia de los micromicetos en el medio, a diferencia de lo que ocurre con la lacasa, la cual si aumenta significativamente su actividad en algunos co-cultivos.

### 6.6 Influencia del tamaño de inóculo en el crecimiento vegetativo de *P. formosus*.

La disminución del tamaño de inóculo incrementó la fase *lag* de los tratamientos X<sub>1000</sub> y X<sub>10000</sub> extendiéndola por un periodo aproximado de un día (Figura 22).

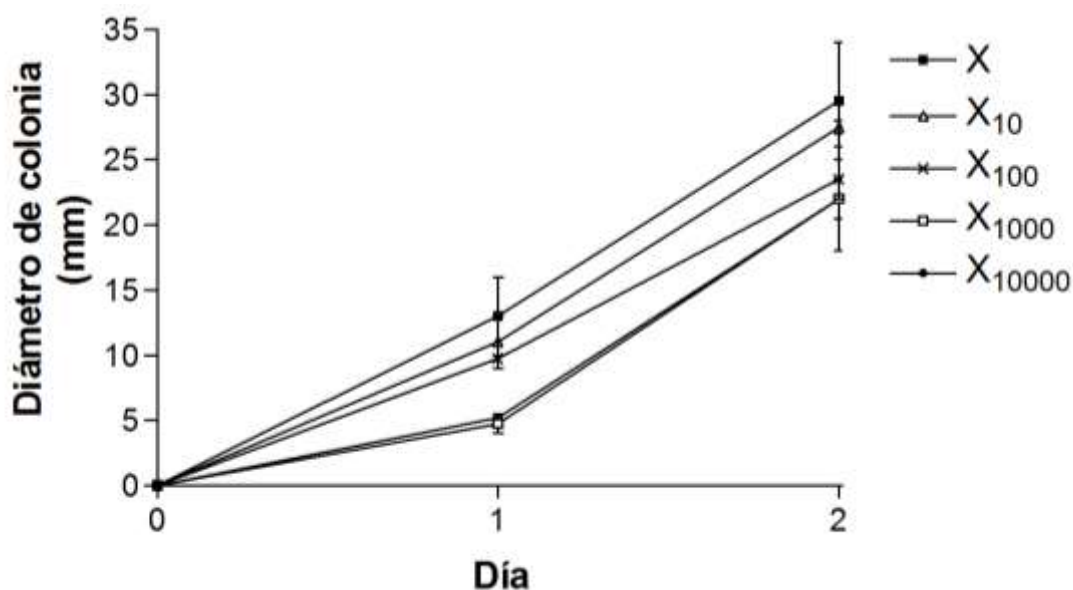


Figura 23. Crecimiento de *P. formosus*

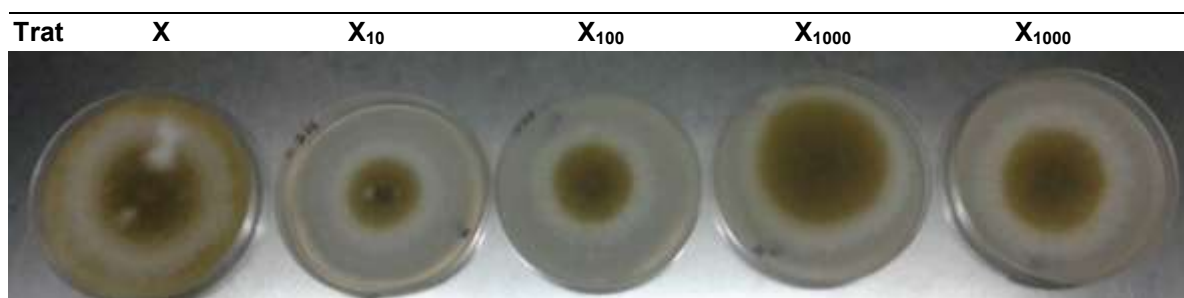
Shida y colaboradores (1975) reportaron por primera vez los efectos directos de la disminución del inóculo sobre la fase *lag* en bacterias. Sus trabajos les permitieron concluir que una menor cantidad de inóculo puede alargar considerablemente la fase *lag* de los cultivos pero afecta muy poco su velocidad de crecimiento. Dichas conclusiones son congruentes con los resultados obtenidos en el presente experimento, ya que no se observaron cambios en la velocidad de crecimiento con un menor tamaño de inóculo.

Tabla 25. Tasa media de crecimiento (TC) y densidad de esporas de *P. formosus*

Tratamiento	TC (mm/día)	Esporas ( $\times 10^6$ )/cm <sup>2</sup>
X	17.6 ± 0.57	17.3
X <sub>10</sub>	17.2 ± 0.71	19.1
X <sub>100</sub>	16.8 ± 0.85	20.5
X <sub>1000</sub>	16.75 ± 0.21	14.9
X <sub>10000</sub>	16.6 ± 0.55	14.5

A pesar de haber disminuido 10000 veces la concentración de esporas en el inóculo, no se encontró una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento de *P. formosus* (tabla 23). La densidad de esporas encontrada varía entre los tratamientos,

sin embargo la diferencia es menor a un orden de magnitud por lo que no se considera que pueda ser importante para el desarrollo del organismo en términos fisiológicos o ecológicos.



**Figura 24.** Imagen del día 5 de incubación de *P. formosus*. Todos los tratamientos cubrieron el área total de la caja.

A partir de la evaluación del crecimiento en placa de *P. formosus*, se identificaron diferencias en la morfología del mismo. En los tratamientos X y X<sub>10000</sub> se observó la mayor parte del área de crecimiento cubierta por esporas ( $92 \pm 4.2$  % y  $80 \pm 6.4$  %) mientras que los tratamientos X<sub>10</sub> y X<sub>100</sub> presentaron un área con esporas menor ( $29 \pm 11$  % y  $34 \pm 13$  %), predominando una fase micelial. El tratamiento X<sub>10000</sub> mostró un área cubierta de esporas mayor que X<sub>10</sub> y X<sub>100</sub> pero menor en comparación con X<sub>1000</sub> y X. La evidencia experimental no indica una correlación directa entre el tamaño del inóculo y estas diferencias morfológicas.

## 6.7 Optimización de producción enzimática a través de un diseño de compuesto central (CCD).

**Tabla 26.** Matriz experimental del CCD en valores naturales y respuestas obtenidas

	Factor			Respuesta		
	Humedad (%)	TF (Días)	TI (Días)	Prot (mg/L)	MnP (U/g)	Lacasa (U/g)
1	65	4.5	1	3.1	1.28	179.4
2	85	4.5	1	2.0	0.96	184.0
3	65	7.5	1	10.2	4.16	188.8
4	85	7.5	1	11.7	8.84	167.4
5	65	4.5	3	1.2	1.15	108.3
6	85	4.5	3	4.7	1.47	109.9
7	65	7.5	3	9.2	0.32	192.7
8	85	7.5	3	14.3	0.90	106.5
9	58.2	6	2	9.1	0.90	219.4
10	91.9	6	2	27.3	4.48	171.0
11	75	3.5	2	5.2	0.83	149.0
12	75	8.5	2	13.4	1.28	148.5
13	75	6	0.3	24.1	5.12	141.5
14	75	6	3.7	13.8	1.92	110.6
15	75	6	2	16.2	0.64	185.2
16	75	6	2	15.7	0.51	195.8
17	75	6	2	14.6	0.64	178.7
18	75	6	2	19.7	1.09	194.9
19	75	6	2	6.8	0.38	157.8
20	75	6	2	20.2	1.15	212.6
21	75	6	2	11.3	0.32	169.3
22	75	6	2	13.3	1.92	173.9

## 6.7.1 Optimización de la actividad de Lacasa

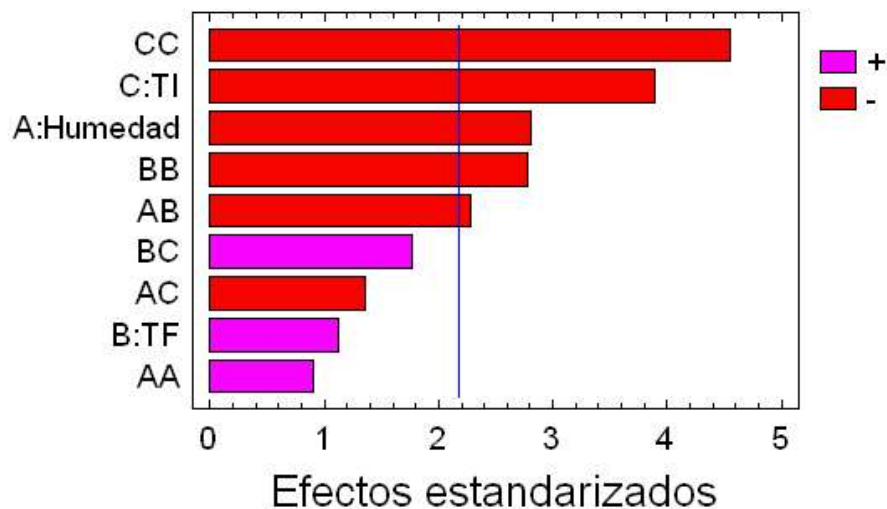
### 6.7.1.1 ANOVA y efectos principales

Tabla 27. Anova para la respuesta Lacasa.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MSS</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
<b>Modelo</b>	19712.6	9.00	2190.3	7.02	<b>0.0013</b>
<b>A-</b>	2442.8	1.00	2442.8	7.83	<b>0.0161</b>
<b>Humedad</b>					
<b>B-TF</b>	386.8	1.00	386.8	1.24	0.2874
<b>C-TI</b>	4733.5	1.00	4733.5	15.17	<b>0.0021</b>
<b>AB</b>	1620.1	1.00	1620.1	5.19	<b>0.0418</b>
<b>AC</b>	574.2	1.00	574.2	1.84	0.2000
<b>BC</b>	972.3	1.00	972.3	3.12	0.1030
<b>A<sup>2</sup></b>	253.0	1.00	253.0	0.81	0.3857
<b>B<sup>2</sup></b>	2374.2	1.00	2374.2	7.61	<b>0.0173</b>
<b>C<sup>2</sup></b>	6452.8	1.00	6452.8	20.68	<b>0.0007</b>
<b>Residual</b>	3745.2	12.00	312.1		
<b>Falta de ajuste</b>	1633.1	5.00	326.6	1.08	0.4448
<b>Error puro</b>	2112.2	7.00	301.7		
<b>Total</b>	23457.9	21.00			

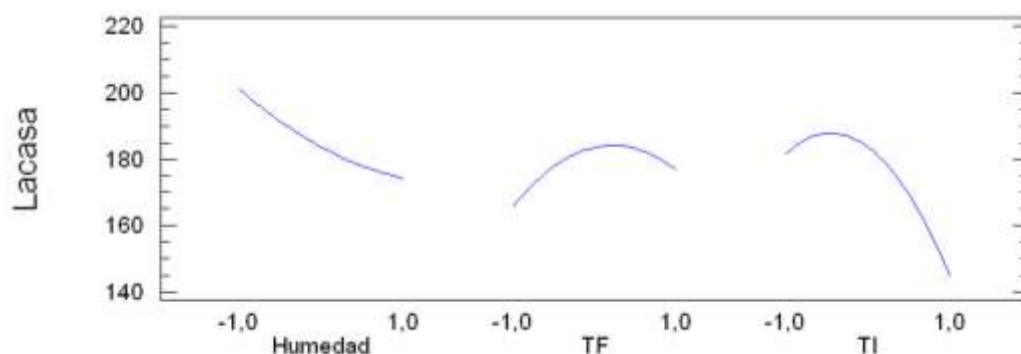
SS= Suma de cuadrados, df= Grados de libertad, MSS=Suma de cuadrados media. F= Valor F de fisher

El análisis de varianza para la respuesta Lacasa mostró un valor significativo para el modelo ( $P = 0.0013$ ). A su vez, los factores Humedad y Tiempo de inoculación tienen un efecto lineal estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ). En cuanto a los efectos por interacción, sólo la interacción entre Humedad y Tiempo de fermentación obtuvo un valor significativo. Los factores Tiempo de Fermentación y Tiempo de Inoculación tuvieron un efecto cuadrático significativo ( $P < 0.05$ ). La falta de ajuste resultó ser no significativa, lo que nos indica que el modelo se ajusta de manera estadísticamente aceptable a la respuesta observada.



**Figura 25.** Gráfica de Pareto estandarizada para Lacasa. Valores a la derecha de la línea vertical son significativos ( $P < 0.05$ ) A= Humedad, B= Tiempo de fermentación, C= Tiempo de inoculación de *P. formosus*

El factor que tiene mayor influencia sobre la respuesta es el tiempo de inoculación de *P. formosus* (figura 25). Los efectos del tiempo de inoculación son cuadráticos y directos y ambos influyen principalmente de manera negativa. A su vez, el efecto cuadrático de TF y el efecto directo de la humedad influyen moderadamente en la actividad de lacasa, mientras que la interacción entre la humedad y el tiempo de fermentación tiene un efecto leve.



**Figura 26.** Gráfico de efectos principales para Lacasa.

En la figura 26 se ilustra la relación entre la actividad de lacasa y la variación de los factores en el espacio de diseño. Resulta importante observar que si bien el gráfico de Pareto nos muestra que los efectos significativos son principalmente



negativos, existen efectos de curvatura (cuadráticos) en los factores TF y TI indicando que para ciertos valores de estos factores el efecto en la respuesta tiende a ser positivo. Para el caso de TI, podemos observar que en la región entre -1 y 0 se observan efectos positivos que después tienden a volverse negativos conforme incrementa el valor de TI, el caso del tiempo de fermentación (TF) es similar, observándose un incremento en la respuesta en valores -1 a 0.4 y un decremento a valores superiores a 0.4.

### 6.7.1.2 Análisis de regresión y diagnóstico del modelo

**Tabla 28.** Resultados del análisis de regresión para Lacasa

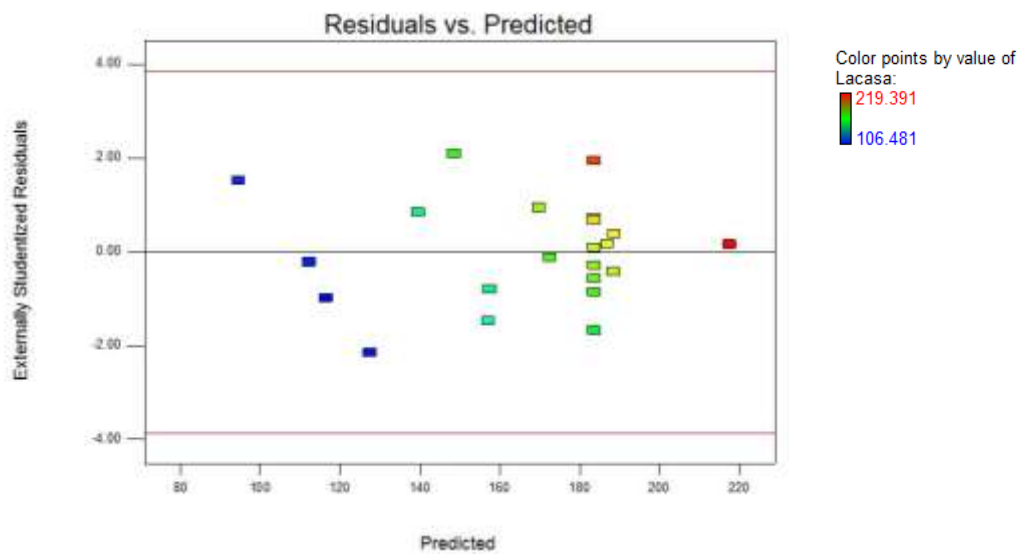
<b>Media</b>	<b>Desv. Estándar</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>Predicción adecuada</b>
165.7	17.7	0.8403	0.72	10.323

El modelo obtenido a través del análisis de regresión indica un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) = 0.8403 lo que se traduce en que el 84.03% de la variabilidad observada en la respuesta puede ser explicada por la variación de los factores establecidos en el diseño. El estadístico predicción adecuada se obtiene al dividir la diferencia entre la respuesta predicha máxima y la respuesta predicha mínima y multiplicando por la desviación estándar promedio de todas las respuestas predichas (Montgomery, 1988) por lo que se desean valores altos de este estadístico, considerándose como mínima una predicción adecuada de 4. El valor del estadístico predicción adecuada = 10.323 indica que se tiene una buena precisión en las estimaciones, haciendo factible la utilización de este modelo para realizar predicciones dentro del espacio de diseño.

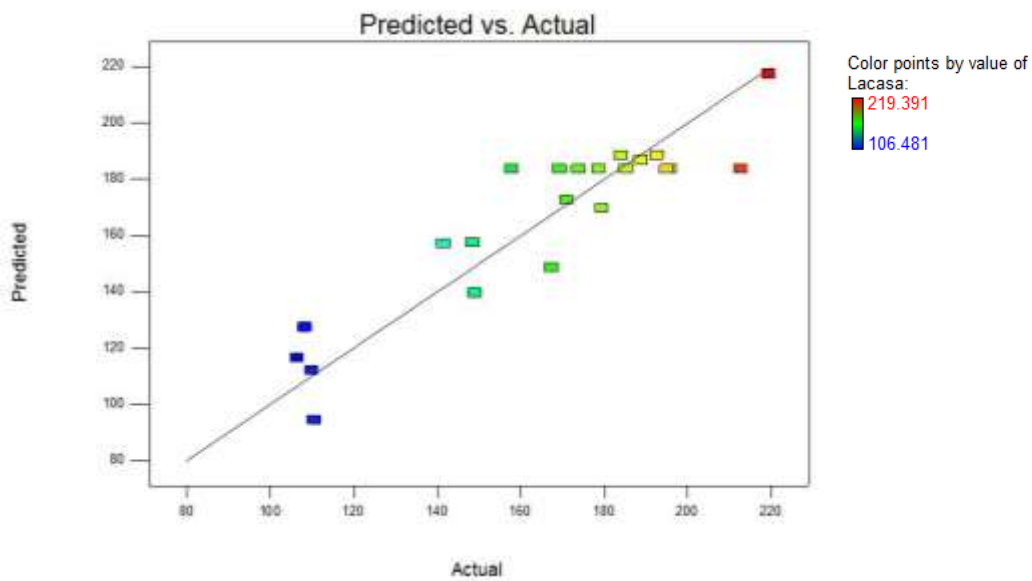
El desglose matemático del modelo se expresa en la ecuación 1.

**Ecuación 1.** Modelo lineal para la respuesta Lacasa (U/g) en unidades codificadas. A= Humedad, B= Tiempo de fermentación, C= Tiempo de inoculación de *P. formosus*

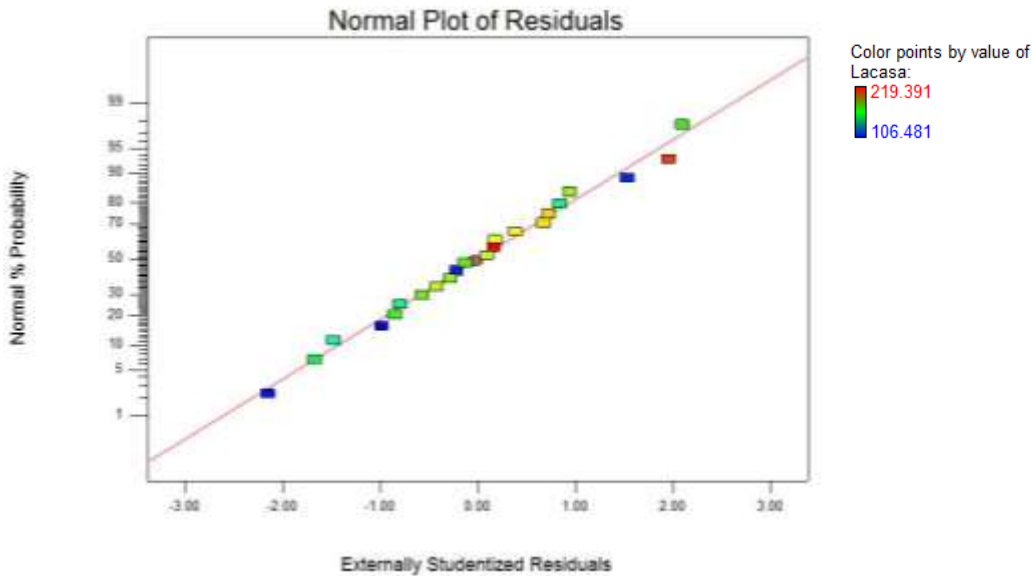
$$Lacasa (U/g) = 183.5 - 13.4*A + 5.3*B - 18.6*C - 14.2*AB - 8.5*AC + 11.0*BC + 4.0*A^2 - 12.4*B^2 - 20.4*C^2$$



**Figura 27.** Análisis de residuales. Valor predicho vs. Valor residual.



**Figura 28.** Análisis de residuales. Valor predicho vs Valor real

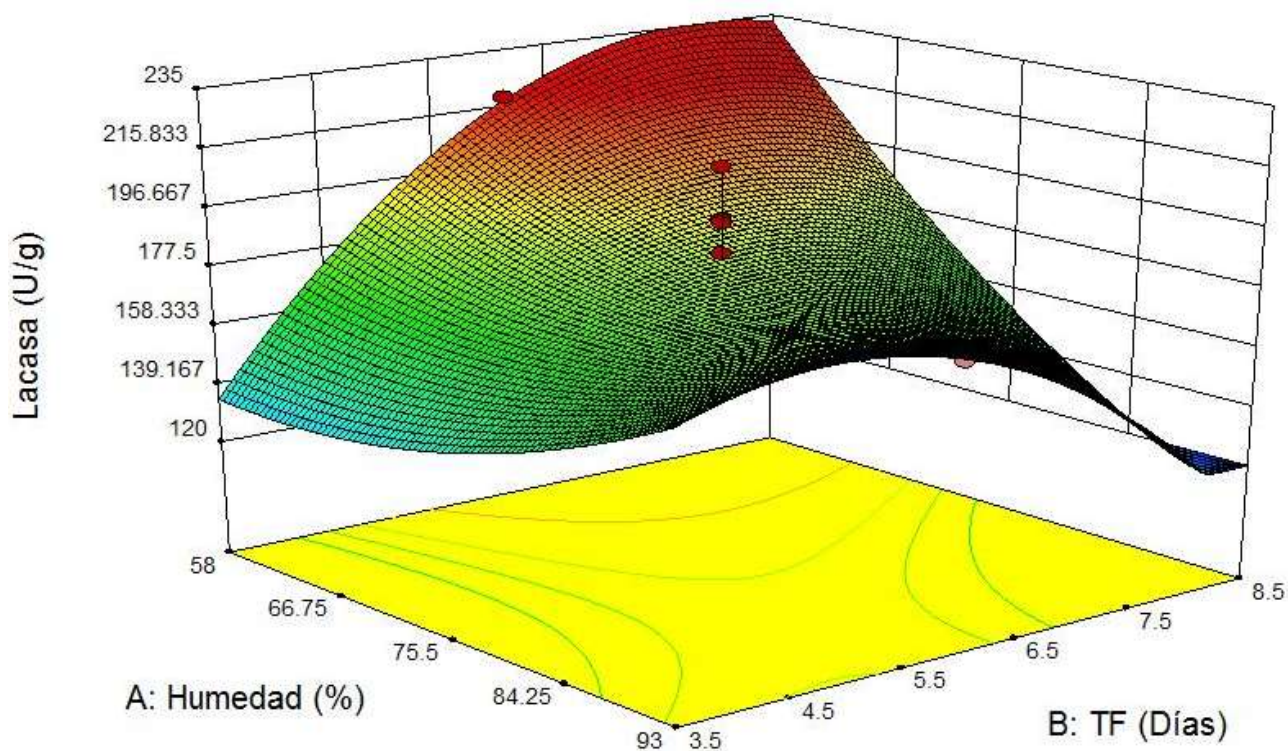


**Figura 29.** Gráfico de probabilidad normal para lacasa

En los gráficos de diagnóstico de Valores Residuales vs. Valores Predichos y Valores Predichos vs. Valores Reales (Figuras 27 y 28) no se observó ninguna tendencia marcada en la varianza, con lo cual se comprobó que el modelo propuesto cumple con el principio de homocedasticidad y no es necesario realizar ningún tipo de transformación a los parámetros. El gráfico de probabilidad normal (figura 29) indica que los datos experimentales siguen una distribución normal, corroborando que el modelo propuesto cumple con el principio de normalidad.

### **6.7.1.3 Superficie-respuesta y optimización.**

El gráfico de superficie-respuesta (figura 29) muestra que la actividad de lacasa puede cambiar al modificar las condiciones de humedad y el tiempo de fermentación (TF). La mayor actividad de lacasa se observa en los valores altos de TF y los valores inferiores de humedad.



**Figura 30.** Superficie-respuesta de Lacasa para la interacción TF vs Humedad. TI= 0 (2 días).

Se optimizó el tiempo de fermentación y el porcentaje de humedad para maximizar la actividad de lacasa . Los resultados de las dos corridas de optimización que estiman mayores actividades de lacasa se presentan en la tabla 29.

**Tabla 29.** Valores naturales óptimos para la maximización de la actividad de lacasa.

Corrida	Factor			Actividad Lacasa (U/g)
	Humedad (%)	TF (Días)	TI (Días)	
1	58.23	7.26	1.82	231.5
2	58.18	7.92	2.2429	235.8

## 6.7.2 Optimización de la producción de MnP

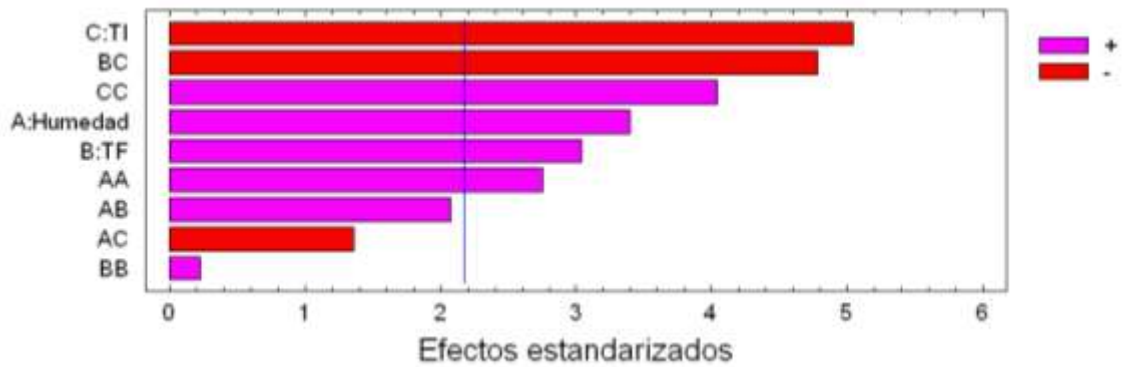
### 6.7.2.1 ANOVA y efectos principales.

Tabla 30. ANOVA para MnP.

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MSS</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	79.66	9.00	8.85	10.93	<b>0.0002</b>
<b>A-</b>	9.33	1.00	9.33	11.52	<b>0.0054</b>
<b>Humedad</b>					
<b>B-TF</b>	7.48	1.00	7.48	9.23	<b>0.0103</b>
<b>C-TI</b>	20.63	1.00	20.63	25.47	<b>0.0003</b>
<b>AB</b>	3.45	1.00	3.45	4.26	0.0614
<b>AC</b>	1.50	1.00	1.50	1.85	0.1991
<b>BC</b>	18.52	1.00	18.52	22.87	<b>0.0005</b>
<b>A^2</b>	6.13	1.00	6.13	7.57	<b>0.0175</b>
<b>B^2</b>	0.04	1.00	0.04	0.05	0.8257
<b>C^2</b>	13.18	1.00	13.18	16.28	<b>0.0017</b>
<b>Residual</b>	9.72	12.00	0.81		
<b>Lack of Fit</b>	7.72	5.00	1.54	5.42	0.12343
<b>Pure Error</b>	1.99	7.00	0.28		
<b>Cor Total</b>	89.38	21.00			

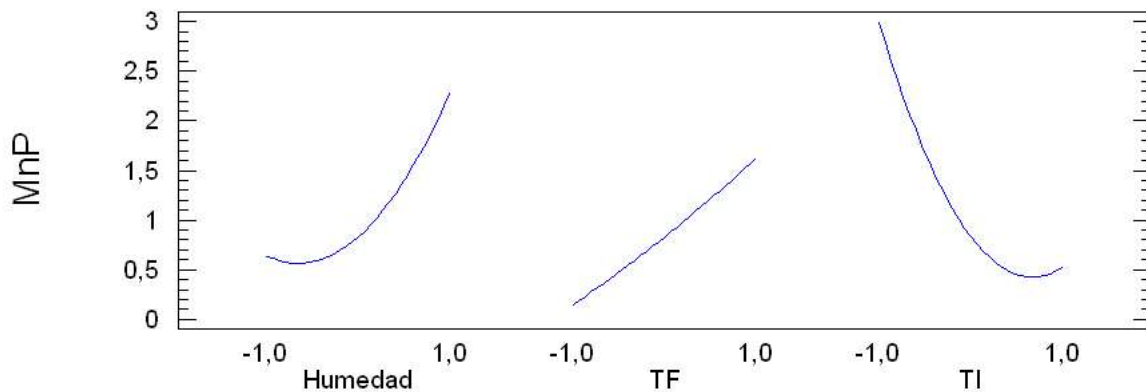
SS= Suma de cuadrados, DF= Grados de libertad, MSS= Suma de cuadrados media.

El valor  $P$  obtenido para el modelo fue igual a 0.0002 lo que indica que el modelo es significativo y la probabilidad de obtener dicho valor  $F$  debido al ruido es tan solo del 0.02%. A su vez, se puede observar que el efecto lineal de todos los factores, al igual que los efectos cuadráticos de la humedad y el TI son significativos ( $P < 0.05$ ). La interacción tiempo entre TI y TF fue la única que tuvo un efecto significativo ( $P < 0.01$ )



**Figura 31.** Gráfico de Pareto estandarizado para MnP. Valores a la derecha de la línea vertical son significativos ( $P < 0.05$ ).

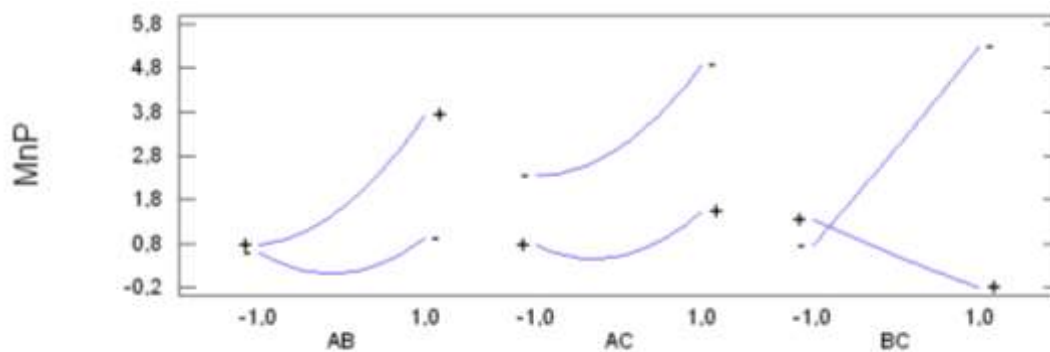
El gráfico de Pareto (figura 31) muestra que los dos efectos más importantes son de carácter negativo y corresponden al tiempo de inoculación (TI) y la interacción entre el tiempo de fermentación (TF) y TI. Existen cuatro efectos positivos significativos que van de moderados a leves y corresponden a  $TI^2$ , Humedad, TF y Humedad<sup>2</sup>.



**Figura 32.** Gráfico de efectos principales para MnP

En la figura 32 es posible observar gráficamente los comportamientos de los efectos principales de los factores estudiados. Humedad y TI presentan efectos cuadráticos significativos por lo que es posible observar un efecto de curvatura. El factor TF no

presenta una curvatura significativa pero su efecto lineal si resulta estadísticamente significativo, sin embargo, la interacción TF-TI (figura 15) es importante por lo que basarnos solo en el efecto individual de TF no es recomendable.



**Figura 33.** Gráfico de interacción para MnP. A= Humedad, B= Tiempo de fermentación, C= Tiempo de inoculación de *P. formosus*.

En la figura 33 se observa que la interacción TF – TI fue altamente significativa, identificándose la mayor respuesta en valores altos de TF y valores bajos de TI. Las otras interacciones entre los factores no resultaron ser significativas.

### 6.7.2.2 Análisis de regresión y diagnóstico del modelo

**Tabla 31.** Valores del Análisis de Regresión para MnP

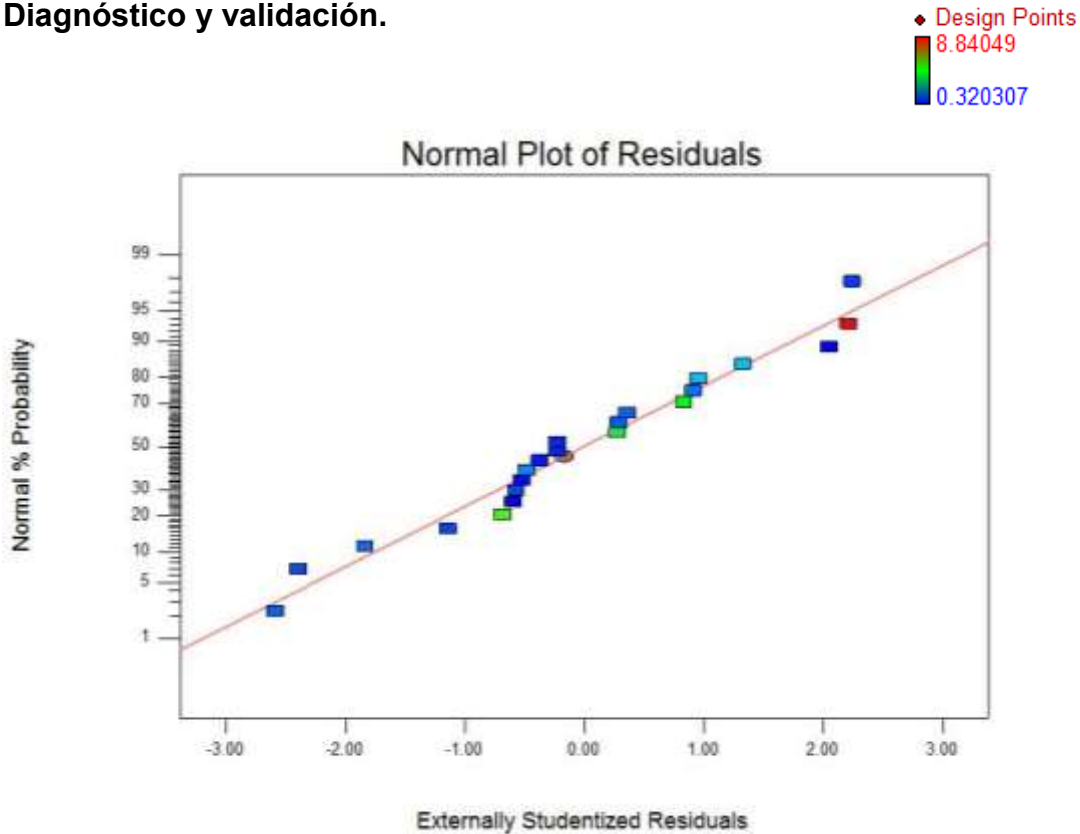
Media	Desv. Estándar	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	Predicción adecuada
1.83	0.9	0.891	0.8087	13.95

El R<sup>2</sup> obtenido en el análisis de regresión fue=0.891 (tabla 29), esto significa que el 89.1% de la variabilidad observada en la respuesta puede ser explicada por nuestro modelo. El estadístico predicción adecuada = 13.95 indica que tenemos una buena precisión en nuestras predicciones, haciendo factible la utilización de este modelo dentro del espacio de diseño.

**Ecuación 2.** Ecuación del modelo de regresión lineal para MnP en valores codificados. A= Humedad, B= Tiempo de fermentación, C= Tiempo de inoculación de *P. formosus*

$$MnP = 0.84 + 0.83*A + 0.74*B - 1.23*C + 0.66*AB - 0.43*AC - 1.52*BC + 0.63*A^2 + 0.051*B^2 + 0.92*C^2$$

### Diagnóstico y validación.



**Figura 34.** Gráfico de probabilidad normal para MnP

El gráfico de probabilidad normal de la figura 34 ilustra que nuestros datos siguen una distribución normal, por lo que asumimos como verdadero el principio de normalidad.

En los gráficos de diagnóstico valores residuales vs valores predichos y valores predichos vs. valores reales (figuras 35 y 36) es posible observar una varianza homogénea, por lo que se asume como verdadero el principio de homocedasticidad en nuestro modelo.



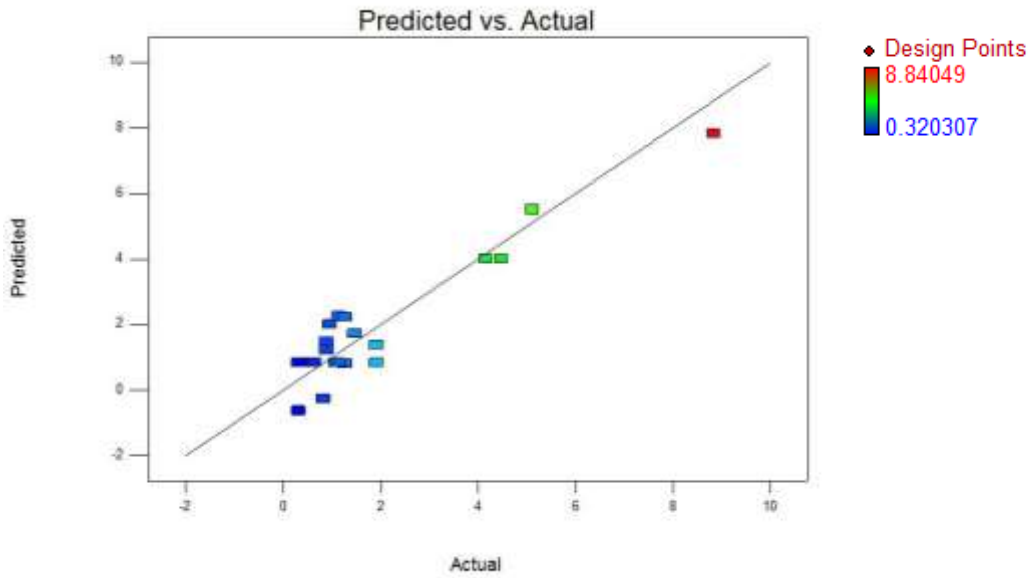


Figura 35. Análisis de residuales. Valor predicho vs valor real

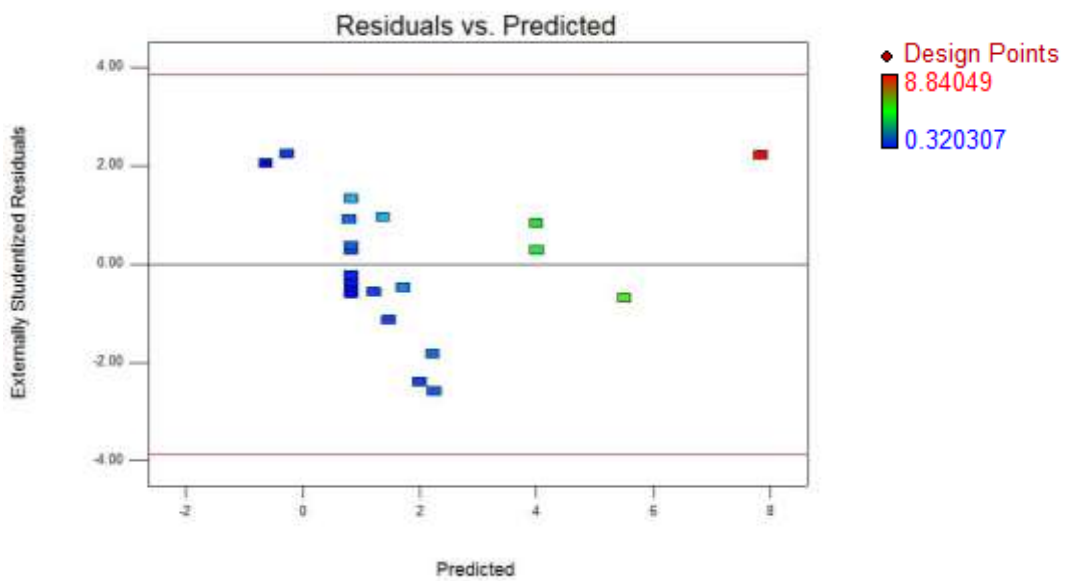
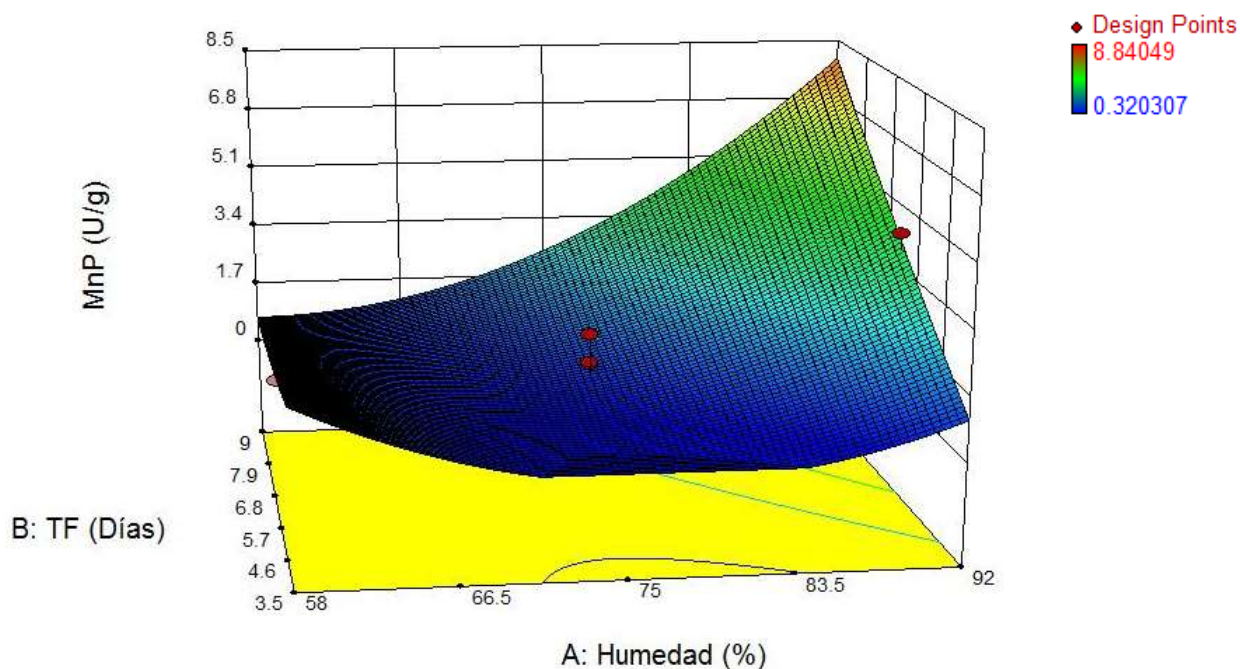


Figura 36. Análisis de residuales. Valores Residuales vs. Valores Predichos

### 6.7.2.3 Superficie respuesta y optimización

Las gráficas de superficie-respuesta son herramientas útiles que nos permiten observar el comportamiento de la respuesta ante los cambios en los diferentes niveles de los factores. En el gráfico obtenido con nuestro modelo (figura 37) se

puede observar que la actividad de MnP varía considerablemente ante distintos niveles de los factores. La mayor actividad de MnP se observa en los valores altos de Humedad como de y Tiempos de Fermentación prolongados (Más de 7 días).



**Figura 37.** Gráfico superficie-respuesta para MnP. C: Tiempo de inoculación= 0 (2 días)

Los valores óptimos se ilustran en la tabla 32. Resulta importante mencionar que a diferencia de la actividad de lacasa, la actividad de MnP aumenta cuando se tiene un alto porcentaje de humedad en el sustrato (alrededor de 90%).

**Tabla 32.** Valores óptimos codificados para maximizar la actividad de MnP

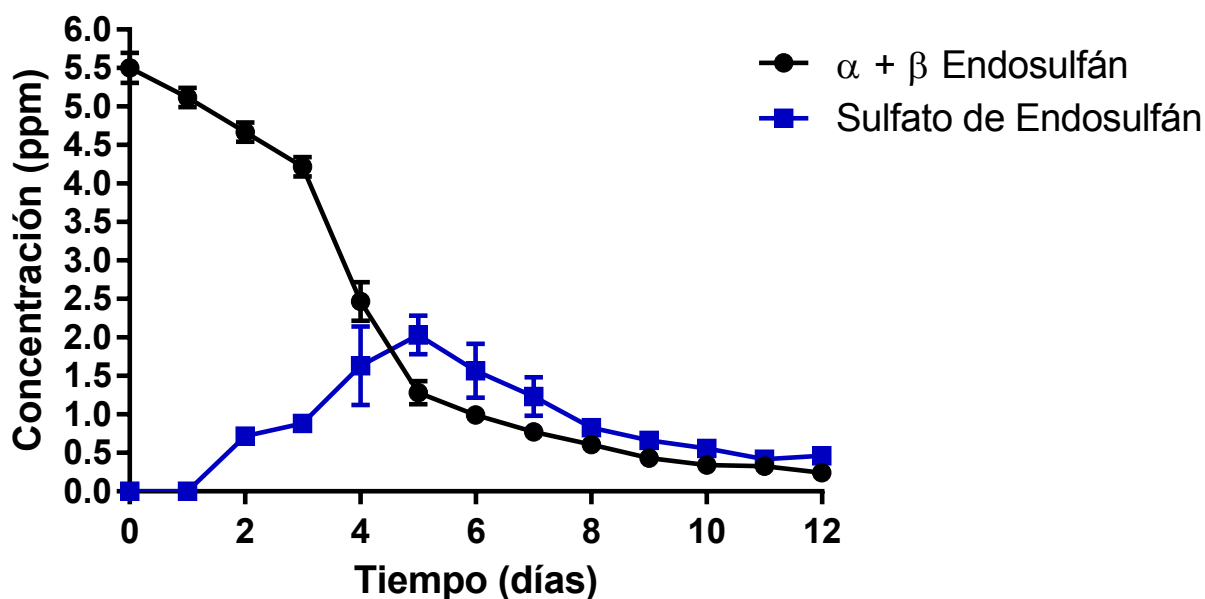
	Factor			MnP (U/g)
	Humedad (%)	TF (Días)	TI (Días)	
<b>Design Expert 9 Statgraphics 5.1</b>	88.96	8	0.42	13.9
	91.9	7.88	0.32	15.5

Los resultados obtenidos nos muestran que los valores óptimos para la actividad de lacasa son diferentes a los valores encontrados para maximizar la actividad de MnP,

por lo que habría que considerar el seleccionar apropiadamente la enzima que sea más efectiva en la degradación del plaguicida ya que una optimización de ambas respuestas parece poco efectiva. Considerando que la lacasa es la enzima con mayores valores de actividad enzimática y que ha sido reportada en mayor medida para la degradación de un espectro muy amplio de contaminantes orgánicos, se seleccionaron los valores óptimos que maximizan la actividad de lacasa para la formación del inóculo a utilizar en la etapa de degradación en el ALB.

## 6.8 Remoción de endosulfán en un ALB

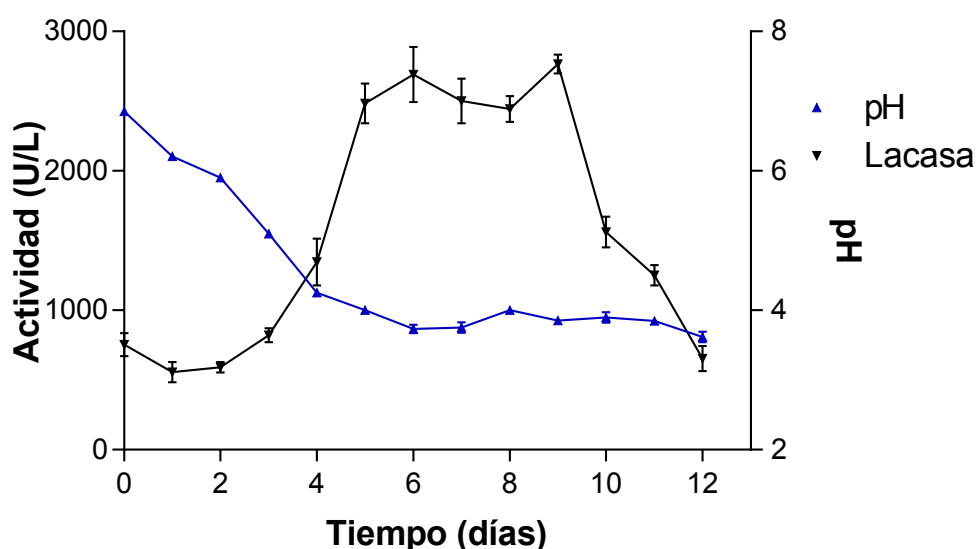
En la figura 38 se observa la degradación de alfa y beta endosulfán así como la producción de sulfato de endosulfán durante las 2 fermentaciones por lote realizadas en el ALB. Durante los primeros 4 días de tratamiento se observa una ligera disminución en la concentración de endosulfán total ( $\alpha + \beta$  endosulfán) disminuyendo de  $5.5 \pm 0.27$  a  $4.23 \pm 0.12$  ppm. Entre el cuarto y sexto día de tratamiento se observó un decremento más pronunciado en la concentración total de endosulfán, disminuyendo de  $4.23 \pm 0.12$  a  $1.3 \pm 0.04$  ppm. La concentración de endosulfán total continuó decreciendo hasta llegar a una concentración final de  $0.24 \pm 0.03$  ppm.



**Figura 38.** Degradación de endosulfán y producción de sulfato de endosulfán en el ALB. Barras de error indican error estándar de la media

A su vez, se detectó una concentración de  $0.07 \pm 0.1$  ppm de sulfato de endosulfán al tercer día y dicha concentración continuó aumentando hasta  $2.02 \pm 0.2$  ppm al

sexto día de tratamiento. A partir del sexto día de tratamiento la concentración de sulfato de endosulfán disminuyó progresivamente hasta un valor final de  $0.43 \pm 0.03$  ppm. De acuerdo con Kamei y colaboradores (2011), la degradación biológica de endosulfán puede llevarse a cabo por mecanismos oxidativos e hidrolíticos siendo los mecanismos oxidativos los más comunes. A su vez, el sulfato de endosulfán es el principal compuesto generado en la ruta oxidativa, sin embargo, se han reportado pocas cepas con la capacidad de descomponer o mineralizar el sulfato de endosulfán. Los resultados obtenidos sugieren que la degradación de endosulfán se lleva a cabo a través de un primer paso oxidativo generando sulfato de endosulfán (detectado a partir del día 3) el cual es degradado posteriormente probablemente por hidrólisis (Bhalerao, 2013). La degradación de sulfato de endosulfán puede deberse a la necesidad de los microorganismos por obtener nutrientes y/o energía una vez que otras fuentes más accesibles se han agotado (Silambarasan, 2013).



**Figura 39.** Actividad de lacasa y disminución del pH. Barras de error indican error estándar de la media

La actividad de lacasa durante las fermentaciones se ilustra en la figura 39. Se observó que durante los primeros cuatro días de fermentación la actividad de lacasa

sufre poca variación, incluso llegando a decrecer, sin embargo, a partir del cuarto día de tratamiento se detectó un aumento significativo en la actividad llegando a niveles cercanos a las 2500 U L<sup>-1</sup>, este aumento en la actividad parece estar relacionado con la disminución del pH dentro del reactor. El pH óptimo para la lacasa varía dependiendo las especies que la producen, sin embargo, la gran mayoría de las lacasas fúngicas reportadas tienen un pH óptimo en el rango de 3 a 5.

## 7. CONCLUSIONES

Se evaluó la tolerancia al endosulfán de 11 micromicetos y 10 Basidiomicetos mediante ensayos toxicológicos *in vitro*. *Pleurotus* sp. fue el basidiomiceto más tolerante ( $CE_{50} = 192.3$  ppm) mientras que *Aspergillus* sp. fue el micromiceto que presentó mayor tolerancia ( $CE_{50} = 625$  ppm). Todos los basidiomicetos, a excepción de *Pleurotus* sp, mostraron una actividad de lacasa significativamente mayor en presencia de endosulfán. *P. sanguineus* ACT, *T. maxima* y Tloco-I mostraron un incremento en la actividad de MnP en presencia de endosulfán.

Las pruebas en medio líquido demostraron que la remoción de endosulfán por procesos de sorción en la biomasa fúngica fue poco significativa (menor al 5%). Todas las cepas evaluadas presentaron capacidad para remover endosulfán. *P. formosus* presentó el porcentaje de remoción de  $\alpha$ -endosulfán más elevado ( $92.41\% \pm 0.8\%$ ). La mayor remoción de  $\beta$ -endosulfán ( $94.8 \pm 1.9 \%$ ) la presentó *Trametes* sp. En todos los tratamientos, a excepción de *P. formosus* y *Pleurotus* sp. se detectó endosulfán sulfato. El tratamiento que presentó una mayor actividad de lacasa fue *Trametes* sp. ( $1835 \pm 365$  U/L) sin embargo no fue posible establecer una correlación clara entre los niveles de actividad de lacasa y la remoción del contaminante. Las cepas *Trametes* sp., *P. Pleurotus* sp., *P. formosus* y *Aspergillus* sp. fueron seleccionadas para los estudios posteriores debido a su alta tolerancia y capacidad de degradación de endosulfán así como a su elevada producción de enzimas ligninolíticas y su compatibilidad en co-cultivo.

Se evaluó el potencial de 5 residuos agroindustriales para ser utilizados como sustrato en el crecimiento y la producción de lacasa de *Pleurotus* sp. y *Trametes* sp. La cáscara de naranja, comparada con los otros sustratos, promovió un crecimiento

más rápido y una mayor producción de lacasa en *Trametes sp.* por lo cual este tratamiento fue seleccionado para los estudios posteriores. Los ensayos de compatibilidad de co-cultivos en cáscara de naranja dieron como resultado la selección del co-cultivo *Trametes sp. / P. formosus*.

Se llevó a cabo una optimización a través de un diseño de compuesto central para la producción de lacasa, MnP y proteína extracelular por el co-cultivo *Trametes sp. / P. formosus* utilizando cáscara de naranja como sustrato. El modelo obtenido fue significativo y validado para las respuestas lacasa y MnP con  $R^2 = 0.84$  y  $0.89$  respectivamente. El tiempo de fermentación óptimo para ambas respuestas fue muy similar (cerca a 8 días), el intervalo de inoculación óptimo varió de aproximadamente 0.4 días para MnP y 2 días para lacasa. Los valores óptimos del factor “% humedad” fueron de 90% para lacasa y 58% para MnP. No se obtuvo un modelo significativo para la respuesta proteína extracelular. Se utilizaron las condiciones óptimas de fermentación que maximizan la producción de lacasa para la producción del inóculo en los ensayos de remoción en el ALB.

La remoción de endosulfán en el ALB alcanzó una eficiencia del 95%, observándose una concentración final de 0.24 ppm después de 12 días de tratamiento. A su vez, se observó la formación y posterior remoción de endosulfán sulfato, detectándose una concentración final de 0.46 ppm, lo que indica que un 8.36% del endosulfán inicial permaneció como endosulfán sulfato, dando una eficiencia “real” de remoción de endosulfán de 86.64%.



## 8 RECOMENDACIONES

I. Probar un sistema para la inoculación del co-cultivo *Trametes sp./P. formosus* a partir de un sustrato no estéril para determinar su capacidad de establecerse aun estando presente la flora nativa.

II. Probar el sistema Airlift en modo continuo.

III. Este sistema mostró una alta eficiencia para la remoción de endosulfán, sin embargo debido al uso de sustratos orgánicos la DQO al final del proceso incrementa, por lo que es necesario acoplar pasos posteriores para remoción de DQO.

IV. Evaluar la eficiencia del sistema utilizando un efluente agrícola real y probar la estabilidad del co-cultivo al estar expuesto a otro tipo de compuestos presentes en dicha agua.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Curva de calibración proteína por método Bradford.

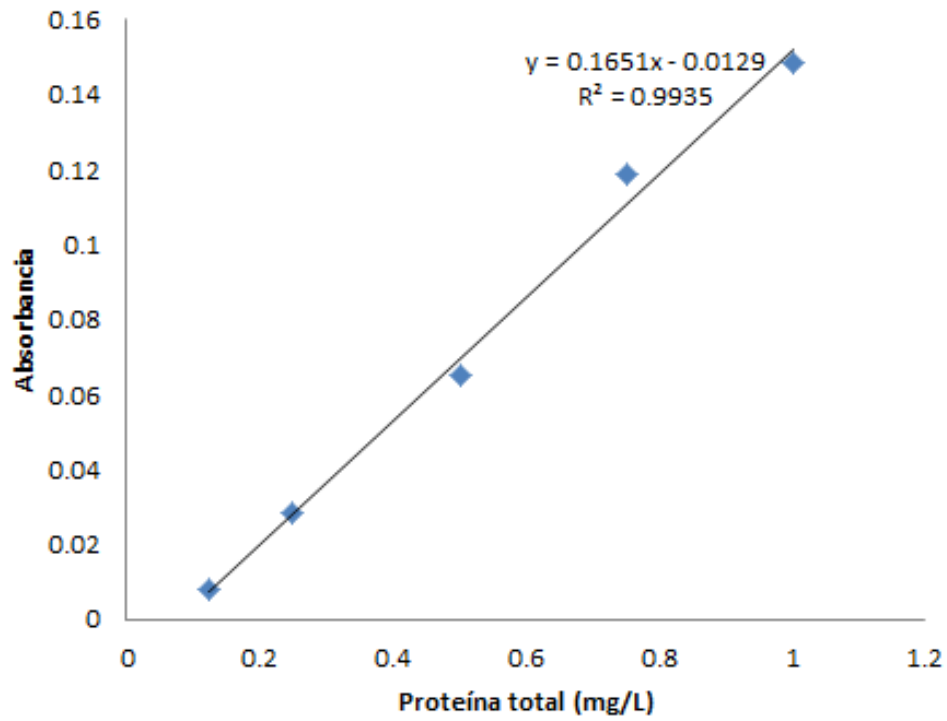


Figura 40. Curva de calibración proteína extracelular método Bradford

## 8.2 Detalles de diseño del cilindro interno y tapa del ALB

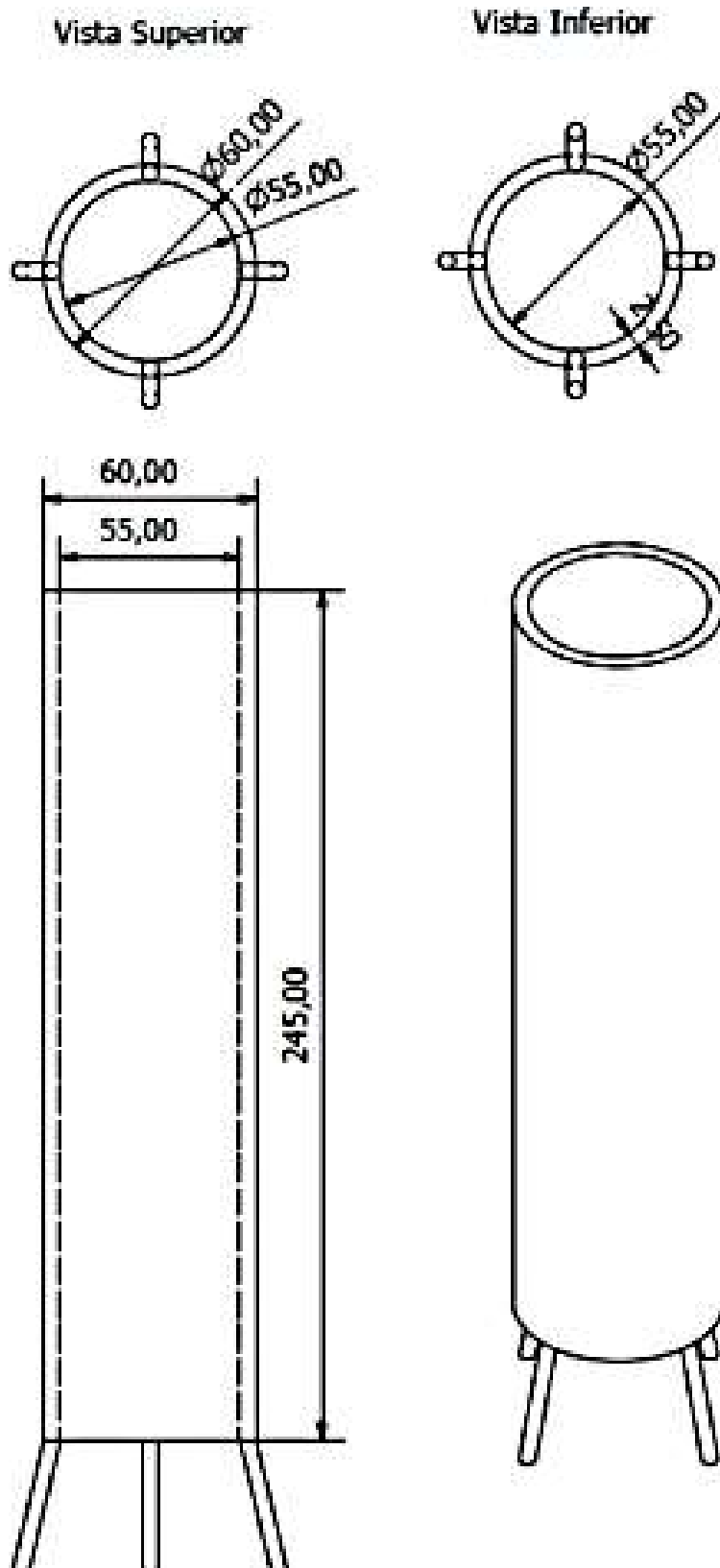


Figura 41. Cilindro interno del ALB

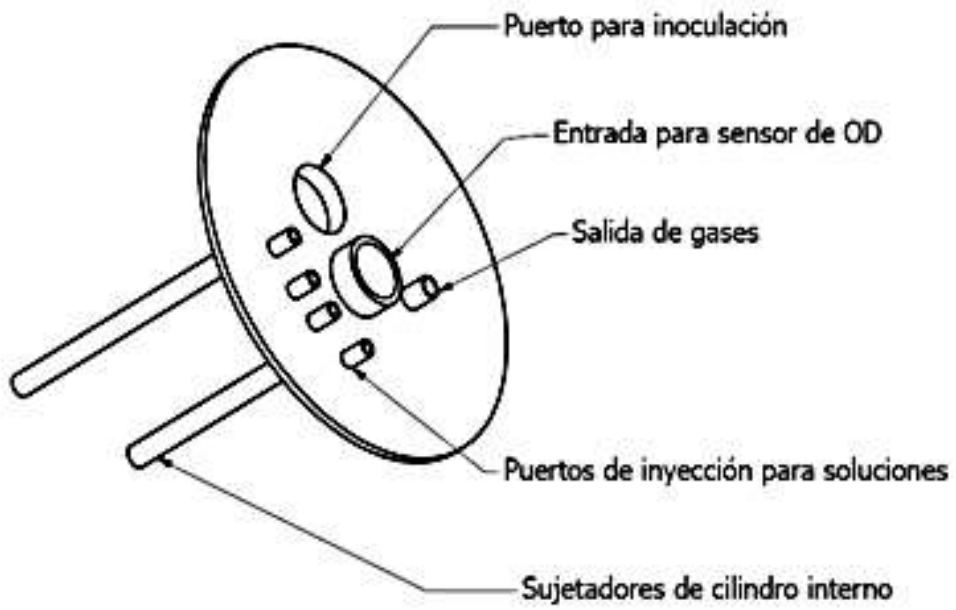
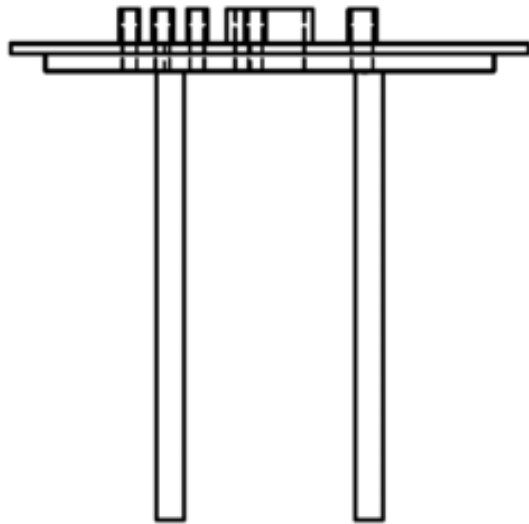


Figura 42. Tapa del ALB

## 10 BIBLIOGRAFÍA

Agematu, H., Shibamoto, N., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. (1993). Oxidative decarboxilation of 4-hydroxymandelic acid and 2-(-4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57:1877-1881.

Amaraneni.S.R, Pillale.R.R (2001) Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru lake in India. Environ.Toxicol. 16(6):550-556.

Arisoy M (1998) Biodegradation of Chlorinated Organic Compounds by White-Rot Fungi. Bull. Environ. Contam. Toxicol 60(6): 872-876

Arrazcaeta L. A, (2002) Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. Fitosanidad. 6(3):55-62.

Asgher M, Bhatti H. A, Ashraf M, Legge R L, (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. Biodegradation 19:771–783.

ATSDR (2000) Toxicological Profile for Endosulfan. Agency of Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA.

Ayala M, Lopez-Munguia A, Robledo N. R, Vazquez-Duhalt R. (2000) Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase catalyzed oxidation of diesel fuel. Environmental Science and Technology. 34(13):2804-2809.

Bader J, Mast-Gerlach E, Popovic M. K, Rajpaj R, Stahl U. (2010) Relevance of microbial co-culture fermentations in biotechnology. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

Barrios-González J, Tomasini A, Viniegra-González G, López L. (1988) Penicillin production by solid state fermentation. Biotechnol Lett 793.doi:10.1007/BF01027575

Bazalel L, Hadar Y, Cerniglia C. E. (1997) Enzymatic mechanism involved in Phenanthrene Degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol. 63(7): 2495–2501.

Bejarano, F, Souza J, Weber J. M, Guadarrama C, Escamilla E, Beristaín B, M. Acosta, Cárcamo M, Ramírez F. (2008) El endosulfán y sus alternativas en América Latina. RAPAL-IPEN-RAPAM-UACH. Santiago de Chile.

Bejarano F, Santibáñez T, Sarmiento-Sánchez T, Ramírez-Muñoz F, Pérez-Consuegra N, Jiménez C, González G, E. Maturana (2009) El endosulfán y sus alternativas en América Latina. Segundo. Reporte. RAPAL-IPEN-RAPAM-UACH Santiago de Chile.

- Berntssen M. H, Glover C. N, Robb D. H, Jakobsen J. V, Petri D (2008) Accumulation and elimination kinetics of dietary endosulfan in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol.* 20; 86 (1):104-11.
- Bertrand S, Schumpp O, Bohni N, Monod M, Gindro K, Wolfender J. L (2013) De Novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *J. Nat. Prod.* 76:1157–1165.
- Bhalerao T. S, Puranik P. R, (2007) Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *Int Biodeterior Biodegrad* 59:315–321.
- Bhalerao T. S, (2012) Bioremediation of endosulfan-contaminated soil by using bioaugmentation treatment of fungal inoculant *Aspergillus niger*. *Turk J Biol* 36:561-567.
- Bhalerao T. S, (2013) Biomineralization and Possible Endosulfan Degradation Pathway Adapted by *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(11), 1610–1616.
- Bogan, B. W, Lamar R. T (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5): 1597-1603.
- Bollag J. M, Dec J, Huang P. M (1998) Formation mechanisms of complex organic structures in soil habitats. *Advances in Agronomy.* 63:237-266.
- Bollag J. M, Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854.
- Boonchan, S., Britz, M. and Stanley, G.A. (2000) Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol.* 66:1007–1019.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1876- 1880
- Bradford M. M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254.
- Bucke, C. 1998. Biochemistry of bioremediation of fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 71(4): 356-357.
- Bumpus, J. A, Tudor F, Jurek M. A, Aust D. (1988) Factors affecting biodegradation of xenobiotics by the white rot fungus *Panerochaete chrysosporium*. *Engineering Foundation. Biotechnology Applications in Hazardous Waste Treatment.* 368-383.

- Campoy C, Jimenez M, Olea Serrano M. F, Olea N, Moreno Frias M, Canabate F, Bayes R, Molina Font J. E. (2001) Analysis of organochlorine pesticides in human milk- preliminary results. *Early Human Dev.* 65 Suppl. S3 183- 190.
- Carvalho F. P, Gonzalez Farias F, Villeneuve J. P, Catilini C, Hernandez –Garza M, Mee LD, Fowler S, W. (2002) Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of north western Mexico. *Environ Technol.* 23(11):1257-70.
- Carvalho, F. P, Nhan D, Zhong C, Tarares T, Klaine S. (1998) Tracking Pesticides in the Tropics. *Bulletin IAEA40* 3: 24-30.
- Carvalho, F. P, Hance R. J. (1993) Pesticides in Tropical Marine Environments: Assessing Their Fate, *IAEA Bullentin* 2:14-19.
- Cerejira M. J, Viana P, Batista S, Pereira T , Silva E, Valerio M. J, Silva A , Ferreira M, Silva Fernandes A, M. (2003) Pesticide in Portuguese surface and ground water. *Water res.* 37:1055- 63.
- Chan-Cupul W, Heredia A. G, Martínez D, Rodríguez-Vázquez R. (2014) Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima–Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett–Burman experimental design. *Electronic Journal of Biotechnology* 17:114–121.
- Chisti Y. (1989) Airlift reactors: current technology. *Airlift Bioreactors*, Elsevier Science Publishers.
- Chisti Y, Jáuregui-Haza U. J. (2002) Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal.* 10: 143-153.
- Christian V, Shrivastava R, Shukla D, Modi H.A, Vyas B. R. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology.* 43(4): 301-312.
- Collins P. J, Kotterman M. J, Field J. A, Dobson A. D. (1996) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(12): 4563-4567.
- Crowe J. D, Olsson S (2001) Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl Environ Microbiol.* 67(5):2088-94.
- Cubby B (2010) Australia joins other countries in banning endosulfán. *The Sidney morning herald.* Oct 13.
- Cuoto S. R, Toca-Herrera J. L, (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances.* 25:558–569.

Dec J, Bollag J. M. (1990) Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19:543-550.

Dewan A, Bhatnagar V. K, Mathur M. L, Chakma T, Kashyap R, Sandhu H. G, Sinha S. N, Saiyed H. N. (2004) Repeated Episodes of Endosulfan poisoning. J. Toxicol. Chin Toxicol. 4294:363-369.

Dierksmeier G. (2001) Plaguicidas, residuos, efectos y presencia en el medio. Ed. Científico-Técnica, La Habana.

Dwivedi P, Vivekanand V, Pareek N, Sharma A, Singh R. A. (2011) Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. New Biotechnology 28 (6).

Durán N, Esposito E. (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental. 28: 83–99.

FAO (1993) Weed Management for Developing Countries. Boletín Fitosanitario no. 120.

FAO (2000) Evaluación de la contaminación del suelo: manual de referencias.

Fatoki O.S, Awofolus O. R. (2004). Levels of organochlorine pesticide residues in marine, surface, ground and drinking water from Eastern Cape Province in South Africa. J.Environ.Sci.Health. 39 (1);101-114.

Fenice M, Sermanni G, Federici F, D'Annibale A. (2003) Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. J Biotechnol 100:77–85.

Gamon M, Saez E, Gil J, Boluda R. (2003) Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice farming soils in a Mediterranean wetland. Arch Environ Contam Toxicol. 44(2):141-51.

Gianfreda, L, Xu F, Bollag J-M. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Biorem. J. 3:1-26.

Gonzalez-Farias F, Gisneros Estrada X, Fuentes Rui Z C, Diaz Gonzalez G, Botello A. V. (2002) Pesticides, distribution in sediments of tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in northwest Mexico. Environ.Technicol. 11; 1247-56.

Goswami S, Vig K, Singh D. K. (2009a) Biodegradation of  $\alpha$  and  $\beta$  endosulfan in broth medium and soil microcosm by bacterial strain *Bordetella* sp. B9. Biodegradation. 20:199–207.



Goswami S, Vig K, Singh D. K. (2009b) Biodegradation of  $\alpha$  and  $\beta$  endosulfan by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere*. 75:883–888.

Guillen-Navarro K, Márquez-Rocha F, y Sánchez-Vázquez J. (1998) Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15:302-306.

Hammel K. E, Tein M, Kalyanaraman B, Kirk T. K. (1986) Mechanism of oxidative  $C_{\alpha}$  –  $C_{\beta}$  cleavage of lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase: Stoichiometry and Involvement of free radicals. *J of Biological Chemistry*. 250:8348 – 8353.

Hess J, Leitner C, Galhaup C, Kulbe K. D, Hinterstoisser B, Steinwender M, Haltrich D. (2002) Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Biochem Biotechnol*. Spring; 98:100-109.

Hill D, Seech A, Bolanos-Shaw K, Molin J. (2008) *In situ* bioremediation of pesticides in soil and groundwater. *Remediation Journal*. 19-1: 87-89.

Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase MnP. *Enzyme and Microbial Technology*. 30(4): 454-466.

Hoh E, Hite RA (2004) Sources of toxaphene and other organochlorine pesticides in North America as determined by air measurements and potential source contribution function analysis. *Environ Sci Technol* 38(15):4187-4194.

Hussain S, Arshad M, Saleem M, Zahir Z. A, (2007) Screening of soil fungi for in vitro degradation of endosulfan. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:939–945.

Ibrahim V, Mendoza L, Momo G, Hatti KR (2011). Blue laccase from *Galerina* sp.: Properties and potential for Kraft lignin demethylation. *Process Biochemistry* 46: 379-384.

Ize-Lema I. (2011) Diagnóstico de la situación del endosulfán en México. Dirección de Investigación sobre Sustancias Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos. Instituto Nacional de Ecología. México.

Kahraman S, Yesilada O, (2001) Industrial and agricultural wastes for laccase production by white-rot fungi. *Folia Microbiol*. 46:133–136.

Kamei I, Takagi K, Kondo R. (2011) Degradation of endosulfan and endosulfan sulfate by white-rot fungus *Trametes hirsuta*. *J Wood Sci*. 57:317–322.

Karam J, Nicell J. A. (1999) Potential applications of enzymes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 69:141-153.

Kataoka R, Takagi K, Sakakibara F, (2010) A new endosulfan degrading fungus, *Mortierella* species, isolated from a soil contaminated with organochlorine pesticides. *J Pestic Sci* 35:326–332.

- Kataoka R, Takagi K, Sakakibara F. (2011) Biodegradation of endosulfan by *Mortierella* sp. strain W8 in soil; Influence of different substrates on biodegradation. *Chemosphere* 85:548–552.
- Katayama A, Matsumura F. (1993) Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ Toxicol Chem* 12:1059–1065.
- Kennedy D, Aust S, Bumpus A. (1990) Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). *Applied and Environmental Microbiology* 56:2347-2353.
- Kim J.D, Lee C.G, (2007) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by bacterium-fungus co-cultures. *Biotech Bioproc. Eng.* 12, 410–416.
- Klemens J. A, Wierland M. L, Flomagin V. J, Frick J. A, Harper R. G. (2003) A cross taxa survey of organochlorine pesticide contamination in a Costa Rica Wet land. *Environ pollute*; 122(2): 245-51.
- Koroleva O, Gavrilova E, Stepanova V, Lebedeva N, Sverdlova E, Landesman O, Ildar S, Yavmetdinov V. (2002) Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated White-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. Russian Academy of Sciences.
- Kullman S. W, Matsumura F. (1996) Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Appl Environ Microbiol* 62:593–600.
- Kumar K, Devi S. S, Krishnamurthi K, Kanada G. S, Chakrabarti T, (2007) Enrichment and isolation of endosulfan-degrading and detoxifying bacteria. *Chemosphere* 68:317–322.
- Kumar M, Lakshmi C. V, Khanna S. (2008) Biodegradation and bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Biores Technol* 99:3116–3122.
- Kuwahara K, Glenn J. K, Morgan M. A, Gold M. H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS. Lett.* 169(2): 247-250.
- Kwon G-S, Kim J-E, Kim T-K, Sohn H-Y, Koh S-C, Shin K-S, Kim D.G. (2002) *Klebsiella pneumonia* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* 215:255–259.
- Liu Y, H.F., Tian, Z.L., Zhu, L.H., Wu, Y.H. and Tang, H.Q. (2008) Diesel pollution biodegradation: synergetic effect of mycobacterium and filamentous fungi. *Biomed Environ Sci* 21, 181–187.

Luo F (2011) The promotion of laccase induced by interspecific interactions and its application to biomass pretreatment. Tesis de doctorado. University of Tokyo.

Madigan M. T, Martinko J. M, Parker J. *Brock Biología de los Microorganismos*, Ed. Prentice-Hall, Madrid. 10ª edición. 2003. Cap 29.

Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A. (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Biotechnol.* 22:335-341.

Mata G, Savoie J. M. (1998) Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:1-7.

Matsumoto E, Kawanaka Y, Yun S-J, Oyaizu H (2009) Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:205–216.

Merchuk J, Gluz M. (2002) Bioreactors, Airlifts Reactors. *Encyclopedia of Bioprocess.* s.l.:s.n., pp. 320-352.

Mester T, Tien M. (2000) Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int Biodeterior Biodegrad* 46:51–59.

Miglioranza K. S, Moreno V. J. (2004) Organo chlorine pesticide sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus ediformicus* (C.A. Meyer) from a shallow lake in Argentina. *Water Res.* 38(7):1765-72.

Miglioranza K. S, Aizpun de Moreno J. E, Moreno V. J (2004) Land based sources of marine pollution: organochlorine pesticide in stream system. *Environ Sci Pollut Res.* 11(4);227-32.

Moreira M. T, Feijoo G, Lema J. M. (2000) Manganese peroxidase production by *Bjerkandera* sp. BOS55. 1. Regulation of enzymatic production. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 23(6):657-661.

Moreira M. T, Feijoo G, Lema J. M. (2003) Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2:247–259.

Mougin, C, Pericaud C, Dubroca J, Asther M. (1997) Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biology and Biochemistry* 29:1321-1324

Mougin C, Kollmann A, Jolival C. (2002) Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol. Lett.* 24, 139-142.

Ntow J. (2001) Organochlorine Pesticides in Water, Sediments, crops and human fluids in a farming community in Ghana. *Arc. Env. Contam. Toxicol.* 40(4) ; 557-563.

- Park D, Hempleman S. C, Propper C. R. (2001) Endosulfan exposure disrupts pheromonal system in the red spotted Newt- A Mechanism for subtle effects of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives* 109(7); 669-673.
- Paszczynski A, Crawford R. L, Huyhn V. N. (1988) Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods in Enzymology* 161, 264-270.
- Potthast A, Rosenau T, Chen C. L, Gratzl J. S. (1995). Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *J. Org. Chem.* 60:4320-4321.
- Quintero J. C, Moreira M. T, Feijoo G, Lema J. M. (2008) Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH). *Cien. Inv. Agr.* 35(2): 159-167.
- Rajeshwar K, Ibanez J. G. (1997) *Environmental electrochemistry: Fundamentals and applications in pollution sensors and abatement.* Editorial Academic press. 776 pp.
- Ramirez J. A, Lacasaña Y. (2001) Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor.* 4(2): 67-75.
- Rancaño G, Lorenzo M, Molares N, Couto S. R, Sanroman M. A. (2003) Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry* 39:467-473.
- Rateb M. E, Hallyburton I, Houssen W. E, Bull A. T, Goodfellow M, Santhanam R, Marcel J, Ebel R. (2013) Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances* 3:1444.
- Riahi S. P, Norouzi M, Bayandori M, Ganjali G, Karimipour H, Sharghi R (2007) Theoretical and experimental report on the determination of oxidation potentials of dihydroxyanthracene and thioxanthens derivatives. *Chemical Physics* 337(1-3): 33-38.
- Sarabia-Rodríguez Laura E (2013) Remoción de DQO de aguas residuales por microorganismos del grano verde de café en un reactor airlift. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.
- Shetty P.K, Mitra J, Murthy N.B. K, Namitha K.K, Savitha K. N, Raghu K. (2000) Biodegradation of cyclodiene insecticide endosulfan by *Mucor thermohyalospora* MTCC1384. *Curr Sci India* 79:1381–1383.
- Siddique T, Okeke B.C, Arshad M, Frankenberger W. T. Jr. (2003) Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J Environ Qual* 32:47–54.
- Silambarasan S, Abraham J, (2013) Mycoremediation of Endosulfan and Its Metabolites in Aqueous Medium and Soil by *Botryosphaeria laricina* JAS6 and *Aspergillus tamaris* JAS9. *PLoS ONE* 8(10).

- Singh B. K, Kuhad R. C. (2000) Degradation of insecticide lindane (gamma-HCH) by white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordida*. Pest Management Science 56:142-146.
- Singh N. S, Singh B. K. (2011) Biodegradation of endosulfan and endosulfan sulfate by *Achromobacter xylosoxidans* strain C8B in broth medium. Biodegradation 22:845–857.
- Souza-Cruz P, Freer J, Siika-Aho M, Ferraz A (2004) Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. Enzyme Microb Technol 34:228–234.
- Thiruchelvam A. T, Ramsay A (2007) Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor. 74:547–554.
- Tariq M I, Afzal S, Hussian L (2004) Pesticide in shallow ground water of Bahawal nagar, Mussafargarh, Khan and Rajanpur districts of Punjab, Pakistan. Environ. Int. 30(4);471-9.
- Takahashi S, Kawashima K, Kawasaki M, Kamito, J, Endo Y, Akatsu K, Horino S, Yamada, R, (2008) Enrichment and characterization of chlorinated organophosphate ester-degrading mixed bacterial cultures. J. Biosc. Bioeng. 106:27–32.
- Thanal (2008) Campaign Ban Endosulfán. ESPAC, IPEN, PANAP, India.
- Ullah, M. A, Bedford C. T, and Evans C. S (2000) Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 230–234
- US EPA (2002) Reregistration eligibility decision for endosulfan. Report No. 738-R-02-013. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., USA.
- US EPA (2007) Method 8018B Organochlorine pesticides by gas chromatography.
- Vaidya A, Datye K. (1982) Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibres. Colourage 14: 3-10
- Van Deuren J, Wang Z, Ledbetter J. (1997) Remediation technologies screening matrix and reference Guide. 3<sup>a</sup> Ed. Technology Innovation Office, EPA.
- Vassilev K, Kambourova V. (2006) Pesticides As Global Environmental Pollutants. In: Simeonov L, Chirila E. (eds) Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats Springer, Berlin, Heidelberg. 173–191.
- Verma P, Madamwar D. (2002) Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 102-103(1-6):109-18.

- Vladimir E, Eva K, Tamar K, Spiros N. (2010) Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. J Ind Microbiol Biotechnol.
- Vorkamp K, Riget F, Glasius M, Pecseli M, Lebeuf M, Muir D. (2004) Chlorobenzene, chlorinated pesticide coplanar chlorobiphenyl, and other organochlorine compounds in Greenland Gota. Sci Total Environ; 331(1-3).
- Weber J, Halsall CJ, Muir D, Teixeira C, Small J, Solomon K, Hermanson M, Hung H, Bidleman T. (2010) Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. Sci Total Environ. 1;408(15):2966-84.
- Weir K. M, Sutherland T. D, Horne I, Russell R. J, Oakeshott J. G (2006) A single monooxygenase, *ese*, is involved in the metabolism of the organochlorides endosulfan and endosulfate in an *Arthrobacter sp.* Appl Environ Microbiol 72:3524–3530.
- Zhang H, Hong Y. Z, Xiao Y Z, Yuan J, Tu X. M, Zhang X. Q. (2006) Efficient production of laccases by *Trametes sp.* AH28-2 in co-cultivation with a *Trichoderma* strain. Applied Microbiology and Biotechnology 73, 89-94.
- Zhang Z, Huang J, Yu G, Hong H. (2004) Occurrence of PAHs, PCBs, and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China. Environ Pollut 2004. Jul ; 130 (2) ; 249-61.
- Zhao T, Wei C. (2013) A new developed airlift reactor integrated settling process and its application for simultaneous nitrification and denitrification nitrogen removal. The Scientific World Journal. Article ID 345725.