



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana**  
*Unidad Iztapalapa*

---

**Estudio de la respuesta fisiológica de hongos  
filamentosos al crecer con sustratos gaseosos  
de diferente grado de hidrofobicidad**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A:

**I.B.I Juan Gabriel Vigueras Ramírez.**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev<sup>1</sup>

Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto<sup>2</sup>

Dra. Marcia Morales Ibarría<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C, c/o IPH, UAM-I

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, UAM-I

<sup>3</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C

Fecha: 27 de marzo de 2007.

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el número de registro **0471-O**”.

Iztapalapa, D.F. a 27 de marzo de 2007.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis: “**Estudio de la respuesta fisiológica de hongos filamentosos al crecer con sustratos gaseosos de diferente grado de hidrofobicidad**”, que presentó: **I.B.I Juan Gabriel Vigueras Ramírez.**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto

Dra. Marcia Morales Ibarría

**Jurado:**

Presidente: Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto

Departamento de Biotecnología. UAM-Iztapalapa,

Secretario: Dra. Marcia Morales Ibarría

Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa

Vocal: Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall

Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa

Vocal: Dra. Raquel Alatorre Rosas

Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad.

Muchos sueñan con alcanzar sus metas.  
Otros preferimos mantenernos despiertos  
para hacer nuestros sueños realidad.

A Dios, a mi Madre y a Juanita

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Sergio Revah por su excelente dirección, asesoramiento, guía, confianza, consejos, paciencia, discusiones y apoyo brindado en todo momento.

A la Dra. Keiko Shirai por su asesoramiento, confianza, apoyo, consejos, tiempo dedicado y la infraestructura de su laboratorio.

A la Dra. Marcia Morales por sus valiosos comentarios, su paciencia, y tiempo dedicado a la revisión y corrección de este documento.

A la Dra. Sylvie Le Borgne por sus valiosos comentarios sobre proteómica y revisión del trabajo.

A la Dra. Raquel Alatorre por revisar y enriquecer este trabajo con sus comentarios.

A Sergio Hdz por sus consejos y apoyo técnico. Laura por compartir sus conocimientos con entusiasmo y paciencia. Neith\* por su amistad, constante optimismo y ayuda en los momentos precisos. Chua por sus valiosos comentarios. Richi por su apoyo y consejos. Dianis por su entusiasmo. Zaizy. Los compañeros y amigos de la PPU4, W-107, S-157 y otros: Miguel, Luis, José, Sonia, Mahi, Juan Carlos, Armando, Irmene, Toño, Mari, Memo, Guztavo, Ulises, Blanquis, los servicios sociales.

A Juanita por su amor, confianza, paciencia, comprensión, apoyo, consejos y comentarios. Por estar a mi lado y ayudarme a mantenerme despierto.

A Maria de la Cruz por darme vida, confianza, apoyo y amor incondicional.

A: Juan, Paco, Luis, Genaro, Margarita, Feliciano, Josefina, sobrinos y cuñados(as).

Al CONACyT por la beca de estudios de maestría No. 188254. A SEP-CONACYT (2004-C01-46173) por financiar parte del trabajo experimental. A la Unión Europea proyecto Alfa Polylife por el financiamiento otorgado para la estancia en la UNICAMP en Brasil.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
2.1 Biotecnología ambiental.....	6
2.1.1 Tecnologías limpias para la prevención de la contaminación.....	7
2.1.1.1 Hongos filamentosos como agentes de biocontrol.....	7
2.1.2 Tecnologías limpias para el tratamiento de la contaminación.....	10
2.1.2.1 Biofiltración de aire contaminado.....	12
2.1.2.2 Hongos filamentosos en biofiltros.....	15
2.2 Biodegradación de sustratos hidrofóbicos por hongos.....	17
2.2.1 Degradación de compuestos cuticulares por hongos.....	18
2.2.2 Degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por hongos.....	19
2.3 Hidrofobicidad superficial de hongos filamentosos.....	21
2.4 Hidrofobicidad, biosurfactantes e hidrofobinas.....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 Objetivos particulares.....	28
3.2 Objetivos general.....	28
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	29
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
6.1 Microorganismos.....	31
6.2 Soporte inerte.....	31
6.3 Medio mineral.....	32
6.4 Sustratos gaseosos.....	32
6.5 Preparación del inóculo.....	32
6.6 Estudio de microcosmos (cultivo en lote).....	33

6.6.1	Controles de consumo de tolueno y hexano.....	33
6.6.2	Hongos entomopatógenos y micopatógenos evaluados para consumir tolueno y hexano.....	34
6.7	Estimación de tasa de consumo de hexano y etanol del hongo seleccionado....	35
6.8	Experimentos en columnas de biofiltración escala laboratorio.....	35
6.9	Determinación de hidrofobicidad superficial de <i>R. similis</i> .....	36
6.10	Determinación de la expresión de hidrofobinas.....	37
6.11	Producción de micelio en agar en ambiente hidrofóbico.....	37
6.12	Extracción de hidrofobinas con ácido fórmico y SDS.....	37
6.13	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	38
6.14	Análisis cuantitativo de la biomasa.....	38
6.15	Cuantificación de proteína.....	39
6.16	Análisis cuantitativo en fase gas.....	39
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
7.1	Evaluación del consumo de tolueno.....	40
7.2	Evaluación del consumo de hexano.....	41
7.3	Estimación de tasas de consumo de hexano y etanol de <i>R. similis</i> .....	43
7.3.1	Cinética de consumo de hexano y producción de CO <sub>2</sub> .....	43
7.3.2	Cinética de consumo de etanol y producción de CO <sub>2</sub> .....	44
7.4	Hidrofobicidad superficial de <i>Rhinocladiella similis</i> .....	46
7.5	Experimentos en columnas de biofiltración escala laboratorio.....	48
7.5.1	Columnas de biofiltración alimentada con hexano.....	48
7.5.2	Columnas de biofiltración alimentada con etanol.....	50
7.6	Determinación de la expresión de hidrofobinas.....	51
7.6.1	Expresión de hidrofobinas <i>R. similis</i> creciendo sobre en agar en ambiente hidrofóbico.....	51
7.6.2	Expresión de hidrofobinas <i>R. similis</i> creciendo en columnas de biofiltración escala laboratorio en ambiente hidrofóbico e hidrofílico.....	53
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>57</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>59</b>

## RESUMEN

Se ha reportado que la degradación de hidrocarburos cuticulares es una ruta metabólica utilizada por hongos para obtener energía (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo, 1990). Crespo et al, 2002 reportaron que al crecer a *Beauveria bassiana* en un medio con n-hexadecano se incremento su virulencia contra su huésped. Trabajos sobre el tratamiento de contaminantes han demostrado que algunos hongos pueden utilizar hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) como única fuente de carbono y energía (Prenafeta-Boldú et al., 2005; García-Peña et al., 2005). En los biofiltros, los organismos crecen sobre un soporte donde el agua libre es escasa y los sustratos volátiles son provistos desde la fase gaseosa. El desarrollo de los hongos filamentosos está particularmente favorecido por la relativa baja actividad de agua y por la acidificación del sistema, resultado de la actividad biológica (Cox et al., 1993; Prenafeta Boldú et al., 2001; Kennes y Veiga, 2004). Se ha sugerido que el micelio aéreo del hongo, el cual está en contacto directo con el gas, podría tomar más rápidamente los compuestos hidrofóbicos que una película plana acuosa característica de las bacterias (Wösten, 2001). Los hongos filamentosos adaptados al crecimiento sobre superficies, presentan características fisiológicas como son la formación de micelio aéreo y superficies hidrofóbicas. Ambas características se encuentran relacionadas con la producción de proteínas de pequeño tamaño molecular, moderadamente hidrofóbicas, exclusivas de los hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos), con actividad surfactante, llamadas hidrofobinas, implicadas en los pasos iniciales de la patogénesis fúngica, donde los hongos necesitan adherirse a la superficie hidrofóbica del huésped (Raymond et al., 1998; Scherrer y Onno 2000; Wösten y Willey, 2000; Pedrós-Marí 2003).

En este trabajo se evaluó la capacidad de hongos conocidos por su aplicación en biocontrol para consumir sustratos gaseosos hidrofóbicos. Además se estudio la respuesta fisiológica que tienen los hongos filamentosos al crecer en un ambiente hidrofóbico, mediante la hidrofobicidad superficial y expresión de hidrofobinas. Estableciendo un estudio inicial acerca de la

utilización de hongos filamentosos en sistemas de biofiltración para tratar corrientes gaseosas contaminadas con hidrocarburos y a su vez obtener algún producto con valor agregado como pueden ser las hidrofobinas.

Los hongos evaluados fueron capaces de consumir tolueno y hexano. El micoparasito *Trichoderma harzianum* fue capaz de consumir el 61.7% de tolueno y el 23.7% de hexano. Mientras que el entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* fue capaz de consumir el 31% de tolueno y el 13.6% de hexano. La hidrofobicidad superficial del hongo *Rhinoctadiella similis* fue mayor a 90° al crecer en un ambiente hidrofóbico generado por el hexano que al crecer en un ambiente hidrofílico con etanol. Lo cual podría estar correlacionado con el tipo de proteínas producidas durante su desarrollo. Ya que existe una clara diferencia en el patrón de bandas de las proteínas producidas por el hongo al crecer en un biofiltro alimentado con hexano (15 kDa y 28.9 kDa) respecto al biofiltro alimentado con etanol (8.5 kDa y 7 kDa), estas últimas podrían tratarse de hidrofobinas clase II las cuales son fácilmente disociadas con SDS al 2%, y que parecen estar relacionadas con el crecimiento del hongo en ambientes acuosos al no formar rodlets. (Wessels, 1997; Wösten, 2001; Stringer and Timberlake, 1995; Lugones *et al.*, 1996; Wetter *et al.*, 2000). Por último se logró establecer el método para la extracción de proteínas de bajo peso molecular (presuntas hidrofobinas) del micelio de *Rhinoctadiella similis* creciendo sobre un soporte sólido en columnas de biofiltración.

# 1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología moderna es una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (biología molecular, ingeniería bioquímica, microbiología, inmunología, entre otras), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microorganismos, plantas y animales). A partir de dicho estudio integral y de la manipulación de los sistemas biológicos, la biotecnología moderna busca hacer un uso inteligente y respetuoso de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva para facilitar la solución de problemas importantes en sectores tales como el de la salud, el agropecuario, el industrial y del medio ambiente. La biotecnología, como herramienta propia de la naturaleza, puede ayudar a alcanzar una producción sustentable a través de la prevención, el tratamiento y la biorremediación de la contaminación; así como por medio del desarrollo de procesos que agreguen valor a los desechos produciendo compuestos útiles que reduzcan la demanda de productos naturales (Bolívar-Zapata, 2002).

La degradación de materia orgánica por hongos puede ser considerada indeseable si se desea preservar el material que es atacado por ellos. Pero en los ciclos de la naturaleza, en donde lo que muere debe ser degradado para que los ciclos de la vida continúen, su papel es vital. Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran frecuentemente colonizando la superficie de líquidos y sólidos. Los hongos han sido ampliamente utilizados en FMS desde los procesos clásicos de producción de alimentos orientales fermentados hasta en la obtención de productos de alto valor agregado, como son las enzimas y metabolitos secundarios como por ejemplo el ácido cítrico. Los hongos filamentosos tienen características fisiológicas que los hacen ser especies dominantes sobre bacterias y levaduras en procesos de fermentación sólida. Su modo de crecimiento a través de hifas es la característica que más ventaja les da a los hongos sobre microorganismos unicelulares en la colonización de sustratos sólidos y en la utilización de nutrientes disponibles. Crecen bien a bajos valores de pH y actividad de agua ( $A_w$ ), lo cual también es ventajoso

para el manejo de un sistema de FMS o biofiltración. A valores elevados de  $A_w$ , superiores a 0.98 la mayoría de los microorganismos encuentran condiciones optimas de desarrollo. Por debajo de 0.87 se inhibe el desarrollo bacteriano y de la mayoría de las levaduras, proliferando únicamente los hongos filamentosos. La unidad estructural de los hongos filamentosos son las hifas, que pueden ser simples o ramificadas y estar tabicadas o no. El crecimiento se produce por alargamiento de las hifas, y da lugar a una masa filamentosa conocida como micelio. Sus hábitats son muy diversos: son típicamente terrestres, saprofitos, simbioses o patógenos, pero también hay formas de agua dulce y algunas marinas.

El crecimiento de los hongos filamentosos dentro de un medio líquido puede producirse en forma dispersa o como pequeñas colonias, denominadas pellets. El modo básico de crecimiento es una combinación de extensión apical de las puntas de las hifas más la generación de nuevas hifas a través de la bifurcación. Un aspecto importante, es que la extensión solo ocurre en la punta de la hifa, este modo de crecimiento apical es soportado por material transportado desde la región de la hifa detrás de la punta. Esto permite una alta velocidad de expansión de la colonia, en ocasiones la velocidad de expansión de la colonia excede la difusión de los químicos del sustrato, lo cual implica que la hifa esta creciendo constantemente en medio fresco de aproximadamente la misma composición y pH del medio inoculado. La bifurcación de las hifas permite la máxima eficiencia en términos de la cantidad de biomasa requerida para cubrir la superficie disponible. Las hifas son también capaces de extenderse entre las partículas de sustrato y de colonizarlo. Además los hongos filamentosos son capaces de regular su frecuencia de bifurcación en respuesta a la concentración del sustrato. A bajas concentraciones la colonia es menos densa y su velocidad de expansión es mayor, de esta forma maximizan su oportunidad de encontrar regiones con mayores concentraciones de sustrato. Los hongos filamentosos pueden así colonizar rápidamente los soportes sólidos para utilizar eficientemente el sustrato disponible (Quintero, 1981; Lema y Roca, 1998; García-Peña, 2002).

La capacidad de algunos hongos para infectar insectos, nemátodos, plantas u otros hongos, los convierte en el grupo de mayor importancia para el control biológico de diversas plagas. Muchos de los sustratos en los que se desarrollan los hongos son sólidos hidrofóbicos por ejemplo la cutícula de los insectos y plantas. Algunos trabajos realizados con hongos entomopatógenos, sobre la degradación de los hidrocarburos cuticulares de insectos, sugieren que ésta es una ruta metabólica importante utilizada por los hongos para la producción de energía (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo, 1990).

En relación al tratamiento de la contaminación ambiental por hidrocarburos, la cantidad de literatura disponible sobre bacterias, ha sido documentada desde 1946, y excede a la literatura disponible para hongos. Esto parecería sugerir que la asimilación directa de hidrocarburos es poco frecuente en hongos. Sin embargo diversos trabajos han demostrado que los hongos son capaces de utilizar a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2005).

Es importante resaltar que las bacterias tienden a crecer rápidamente en medio acuoso, donde los hongos, especialmente los hongos filamentosos, crecen lentamente y, en general, poco adaptados para crecer en sustratos líquidos. Sin embargo en los biofiltros, los organismos crecen sobre un soporte donde el agua libre es escasa y los sustratos volátiles son provistos desde la fase gaseosa. El desarrollo de los hongos está particularmente favorecido por la relativa baja actividad de agua y también por la acidificación del sistema, resultado de la actividad biológica (Cox *et al.*, 1993; Prenafeta Boldú *et al.*, 2001; Kennes y Veiga, 2004).

También se ha sugerido que el micelio aéreo del hongo, el cual está en contacto directo con el gas, podría tomar más rápidamente los compuestos hidrofóbicos en comparación con una película plana acuosa característica de las bacterias (Wösten, 2001)

Los hongos filamentosos naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, presentan características fisiológicas como son la formación de micelio aéreo y superficies hidrofóbicas. Ambas características se encuentran relacionadas con la producción de proteínas de pequeño tamaño molecular, moderadamente hidrofóbicas, exclusivas de los hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos), con actividad surfactante, llamadas hidrofobinas, implicadas en la absorción de esporas o hifas a superficies hidrofóbicas y en la formación de estructuras aéreas hidrofóbicas como son el micelio y cuerpos fructíferos, también poseen gran importancia en los pasos iniciales de la patogénesis fúngica, donde los hongos necesitan adherirse a la superficie hidrofóbica del huésped antes de la penetración y posterior infección. Los biosurfactantes son una clase de surfactantes producidos por microorganismos, plantas y animales. Suelen ser glicolípidos, polisacáridos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos o mezclas de estos polímeros. Una característica única de los biosurfactantes es su capacidad de auto-ensamblarse en la interfase hidrofóbica-hidrofílica capaces de modificar las propiedades de los sólidos y estabilizar burbujas de gas y gotas de aceite en agua. Se ha sugerido que este tipo de moléculas, permiten aumentar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos.

Las hidrofobinas son abundantes proteínas fúngicas que han recibido una considerable atención en años recientes. Son proteínas pequeñas moderadamente hidrofóbicas las cuales se caracterizan por tener un patrón conservado de ocho residuos de cisteína, incluyendo dos dobletes de cisteínas. Aprovechando su principal característica para cambiar las propiedades biofísicas de una superficie podrían ser empleadas para adherir moléculas a superficies por las que normalmente no se tiene afinidad, ej. inmovilización de células o proteínas a superficies, así como la inmovilización de anticuerpos en biosensores. El nivel de la actividad superficial de las hidrofobinas puede compararse con los surfactantes sintéticos por lo tanto pueden emplearse como agente dispersantes en diferentes ramas de la industria (Scholtmeijer *et al.*, 2001).

En este trabajo nos interesa evaluar la capacidad de hongos conocidos por su aplicación en biocontrol para consumir sustratos gaseosos hidrofóbicos, y estudiar la respuesta fisiológica que tienen los hongos filamentosos al crecer en un ambiente hidrofóbico, mediante la hidrofobicidad superficial y expresión de hidrofobinas. Lo anterior con el fin de buscar algún tipo de correlación entre la producción de estas proteínas y la hidrofobicidad superficial del hongo al crecer en un biofiltro. Estableciendo un estudio inicial acerca de la utilización de hongos filamentosos en sistemas de biofiltración para tratar corrientes gaseosas contaminadas con hidrocarburos y a su vez obtener algún producto con valor agregado como pueden ser las hidrofobinas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biotecnología ambiental

Las sociedades actuales enfrentan serios problemas de contaminación ambiental, a consecuencia del desarrollo humano y tecnológico de las últimas décadas. Se espera que la biotecnología ambiental tenga una mayor aplicación en la industria, pues se pueden generar tecnologías limpias y sustentables basadas en las capacidades biológicas conocidas. El concepto de tecnologías limpias se coloca en un punto más alto en la jerarquía de gestión de desechos que la tradicional tecnología a "final del tubo". La base de la gestión, mediante los métodos de final del tubo, se encuentran entre los principios de control que se apoyan en la suposición de que el daño ambiental puede evitarse o al menos disminuirse sensiblemente, controlando la forma, tiempo y tasa por la cual los contaminantes se liberan al medio ambiente. Sus instrumentos principales son la prevención y el tratamiento. La prevención de contaminación dentro de un marco industrial puede definirse como el uso de materiales, procesos o prácticas que reducen o eliminan la creación de contaminantes o desechos en la fuente. Incluye prácticas que reducen el uso de materiales peligrosos, energía, agua u otros recursos y prácticas que protegen los recursos naturales a través de su conservación, uso más eficiente, así como del desarrollo de tecnologías para el reciclado y reutilización de los recursos naturales. Después de la prevención, se consideran las tecnologías para el tratamiento a "final del tubo", en donde las corrientes contaminadas son tratadas hasta que puedan ser reincorporadas a la naturaleza sin efecto nocivo. En los procesos biotecnológicos para el tratamiento de contaminantes, se aprovecha la capacidad que tienen algunos organismos (microorganismos o plantas) para degradar moléculas contaminantes con el fin de obtener energía y crecer. Una ventaja de estos procesos es la completa biodegradación de los contaminantes hasta  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , biomasa y/o compuestos inocuos, y no sólo transferirlos a otra fase (Bolívar-Zapata, 2004; Quintero, 1981; Lema y Roca, 1998).

### **2.1.1 Tecnologías limpias para la prevención de la contaminación**

En el campo de las tecnologías limpias para la producción se encuentra uno de los retos más interesantes de la biotecnología. Estas dependen crecientemente de recursos renovables, incorporan materiales usados, utilizan sustancias menos peligrosas, y brindan productos o servicios compatibles con el medio ambiente generando un mínimo en desechos capaces de ser reincorporados a los ciclos naturales (Bolívar-Zapata, 2002).

Mediante los avances de la química y ciencia de materiales, un sin fin de compuestos sintéticos han sido producidos, sin embargo algunos de ellos han resultado ser tóxicos o altamente contaminantes para el ambiente. En los últimos años se han utilizado métodos biotecnológicos para obtener productos que presentan distintas aplicaciones y beneficios ambientales. Por ejemplo los biopolímeros obtenidos de microorganismos u organismos superiores podrían reemplazar a algunos de los polímeros existentes o encontrar nuevas aplicaciones. El uso de enzimas puede ayudar a minimizar el uso y emisión de sustancias tóxicas en el caso de procesos muy contaminantes como curtiduría textiles pulpa y papel. El control biológico de plagas puede ayudar a reducir el uso de plaguicidas sintéticos algunos de los cuales han resultado ser poco compatibles con el medio ambiente.

#### **2.1.1.1 Hongos filamentosos como agentes de biocontrol**

El control biológico o biocontrol se define como el uso de organismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos (Cook, 1998). El uso de extractos vegetales para el control de plagas agrícolas ha sido una práctica ancestral ampliamente utilizada en diversas culturas y regiones del planeta. Sin embargo el uso de plaguicidas sintéticos, algunos de los cuales han resultado ser altamente tóxicos y/o recalcitrantes han provocado un impacto negativo sobre los organismos presentes en el ambiente. En los últimos años, se ha buscado un equilibrio entre la producción agrícola, el hombre y el ambiente.

Por lo que el desarrollo y aplicación de agentes biológicos para el control de plagas ha resultado ser una alternativa eficaz por su acción específica sobre el objetivo, impacto bajo o nulo sobre organismos circundantes y cultivos, por lo cual se considera una tecnología limpia. Se ha sugerido utilizar formulaciones con extractos protéicos o con los microorganismos que los producen para controlar diversas plagas (Smirnoff 1971; Grupta *et al.*, 1994; Mendosa *et al.*, 1996).

Dentro de los organismos utilizados como agentes de control biológico se encuentran virus, bacterias, hongos, nemátodos y protozoos fundamentalmente. Estos organismos infectan al organismo huésped (insectos, hongos o malezas) por ingestión o por contacto. La capacidad de algunos hongos para infectar insectos, nemátodos, plantas u otros hongos, los convierte en el grupo de mayor importancia para el control biológico de diversas plagas.

Schachter (1996) ha descrito algunos mecanismos que tiene los hongos para infectar a su huésped, los cuales resultan sorprendentes. Describe a un hongo fitopatógeno que induce cambios en la planta invadida, cuyas hojas adquieren la organización y color de las flores y en cuya superficie dulce y pegajosa crece el hongo formando esporas. Estas pseudo-flores atraen insectos que al libar la miel, en vez de polen transportan las esporas del hongo a otras plantas, que son así invadidas. Más extraño aún es el caso de hongos que atacan insectos que normalmente viven enterrados en el suelo. Los insectos infectados cambian su conducta, abandonando sus madrigueras y subiendo a los árboles donde se fijan hasta morir, cubiertos por millones de esporas, que son dispersadas por el viento y el agua. Recientes estudios han descubierto que el hongo *Metarhizium anisopliae* produce algunas sustancias químicas que atraen al insecto huésped, las cuales han comenzado a ser patentadas debido a sus diversas aplicaciones (Ruiz, 2001; Schachter, 1996;).

En base al tipo de organismo huésped, los hongos utilizados para control biológico se clasifican en: entomopatógenos que infectan insectos, los fitopatógenos que infectan a plantas y los micopatógenos que infectan a hongos. Comercialmente destacan los siguientes géneros de hongos utilizados en control biológico: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Trichoderma*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (López y Börje, 2001). Se han descrito varios mecanismos de acción de los agentes de biocontrol entre ellos están: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook y Baker 1983).

Por ejemplo el inicio de la infección de los hongos entomopatógenos sobre el huésped se produce con la adherencia del conidio a la cutícula del insecto. En todos los casos la unidad infectiva es la espora (reproducción sexual) o la conidia (reproducción asexual). Posteriormente éste produce un tubo germinativo y un apresorio, como producto de la dilatación de la hifa. En la penetración están presentes dos procesos principales: el físico, debido a la presión de la hifa, la cual rompe las áreas membranosas esclerosadas y el químico, resultante de la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas), lo cual facilita la penetración mecánica. A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización, en el cual la hifa sufre un engrosamiento y se ramifica en la cavidad general del cuerpo. A partir de ese momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales (blastosporas). Después de la muerte del insecto, el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por hifas. La colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: hemocitos, cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de malpigio, hipodermis, sistema nervioso, músculos y traqueas. Después de 48 a 60 horas de la muerte del insecto, las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, ano y boca a través de las áreas más débiles (regiones intersegmentales). La dispersión de las esporas se realiza por el viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entrar en contacto con otros sanos. De modo similar los hongos fitopatógenos deben penetrar al interior de la planta huésped, para lo cual utilizan diversas estrategias, algunos

ingresan en las plantas a través de heridas y aberturas naturales. En el caso de plantas intactas el hongo utiliza estructuras especializadas, tales como apresorios, para poder penetrar o ingresan usando enzimas que degradan la cutícula y pared celular del huésped. La mayoría de los hongos fitopatógenos colonizan todos los órganos de la planta, como son hojas, vástagos y raíces. Algunos hongos matan a su huésped y se alimentan del tejido muerto, mientras que otros colonizan al huésped vivo e incluso en algunos casos requieren de tejido vivo para terminar su ciclo vital. La mayoría de las plantas presentan resistencia a la mayoría de hongos patógenos, ya que cuentan con barreras físicas o respuesta química a señales tempranas de riesgo (López y Börje, 2001).

### **2.1.2 Tecnologías limpias para el tratamiento de la contaminación**

La biotecnología ambiental generalmente ha sido descrita más como una tecnología de remedio que como una tecnología relacionada con el medio ambiente. Como ya se mencionó después de la prevención, se consideran los procesos de tratamiento terminal a "final del tubo", en donde las corrientes contaminadas son tratadas hasta que puedan ser reincorporadas a la naturaleza. La biotecnología ha desempeñado un importante papel en el tratamiento de contaminantes, proceso que se realiza de manera sistemática en los diferentes medios: agua, suelo y aire. La biotecnología, ha sido aplicada en el tratamiento de las aguas residuales, aprovechando la capacidad que tienen los microorganismos para degradar la materia orgánica (coloidal y disuelta en el agua) para obtener energía y crecer. Entre los procesos para restaurar los suelos contaminados está la biorremediación, que ha sido empleada para tratar residuos o derrames de hidrocarburos, gasolinas, diesel, petróleo crudo y residuos de refinería (naftaleno, estireno, pireno, antraceno, tetrahidrofurano, etc.), pesticidas y sus derivados, solventes clorados y compuestos derivados de la manufactura de hidrocarburos alifáticos clorados, hidrocarburos aromáticos halogenados y aún algunos bifenilos policlorados, solventes no halogenados, etc. (Bolívar-Zapata, 2002).

En cuanto a los contaminantes del aire, éstos son emitidos continuamente a la atmósfera por la actividad humana teniendo efectos regionales y globales. De hecho, la Ciudad de México y Área Metropolitana con alrededor de 4 millones de vehículos y cerca de 20 millones de habitantes, se encuentra dentro de las 21 ciudades con mayor contaminación atmosférica del mundo. En los últimos años hubo un mejoramiento de la calidad del aire del D.F., atribuido al conjunto de medidas permanentes y de emergencia adoptadas de acuerdo con el PROAIRE, aunque el nivel de ozono permaneció elevado, debido a que sus niveles son difíciles de disminuir, ya que su formación resulta de la combinación de otros dos contaminantes los COV's y NOx's (Simioni, 2003). Se han establecido normas que se acercan a las propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), excepto en los casos del carbono y el dióxido de azufre, respecto de las cuales las normas de las metrópolis latinoamericanas son más permisivas (Lizuka y Nicod, 2000).

La contaminación atmosférica es originada de fuentes naturales y antropogénicas. Dentro de las fuentes naturales podemos mencionar los granos de polen, esporas de hongos y las erupciones de los volcanes como: cenizas, partículas, compuestos volátiles, dióxido de azufre, NO<sub>x</sub>, CH<sub>4</sub> (Vesilind *et al.*, 1990). La contaminación proveniente de fuentes antropogénicas se ha incrementado exponencialmente con la revolución industrial. Estas pueden ser divididas en dos tipos: **a) Fuentes móviles:** originadas por el transporte de material o personas: automóviles, aviones, embarcaciones, camiones, ferrocarril, etc. **b) Fuentes fijas:** generadas por la industria de energía eléctrica y actividades industriales como: la química, maderera, textil, alimentaria, procesadora de productos vegetales y animales, metalúrgica, curtidurías, tintorerías, imprentas, lavado de componentes, entre otras. Además, esta fuente incluye la emisión de plantas de tratamiento de agua residual, plantas de composteo, rellenos sanitarios, etc. Los principales contaminantes regionales de las ciudades industrializadas son las partículas suspendidas (PS), los compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles (COVs y CIVs) (Arriaga, 2005a). Muy pocas empresas enfrentan el problema de emisiones de una forma proactiva, es decir, tratando de alcanzar normas internacionales. Existen ciertos tipos de empresas muy vulnerables a la presión social, como son las que generan olores desagradables (plantas de tratamiento, basureros, depósitos,

plantas de alimentos, etc.) o manejan sustancias volátiles peligrosas como solventes o monómeros (Bolívar-Zapata, 2002). La aplicación de tecnologías convencionales de tratamiento ha sido una práctica común en las actividades reguladas como es el caso de las emisiones por combustión o el caso de partículas. En estos casos son usados equipos fisicoquímicos tradicionales como ciclones, filtros, precipitadores, lavadores, etc. Una de las alternativas de tratamiento prometedoras por su bajo costo y bajo impacto ambiental se basa en los tratamientos biológicos, los cuales están basados en la capacidad de los microorganismos para transformar algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos (Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

### **2.1.2.1 Biofiltración de aire contaminado**

El tratamiento biológico de aire contaminado representa una alternativa eficaz para tratar un amplio número de contaminantes, en concentraciones bajas y para un amplio rango de flujos, que fue utilizada esporádicamente entre los 20's y 40's pero su aplicación se acentuó a finales de los 80's. Comparadas con las tecnologías físico-químicas, donde los componentes son algunas veces simplemente transferidos de una fase a otra, los tratamientos biológicos son una de las alternativas de tratamiento de aire más prometedoras por su bajo costo y bajo impacto ambiental, los cuales están basados en la capacidad de los microorganismos para transformar algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos inócuos o menos tóxicos (Ottengraf, 1983; van Lith, 1986; Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

Una de las ventajas más importante de los métodos biológicos sobre los fisicoquímicos es que el proceso biológico puede llevarse a cabo a temperaturas cercanas a la ambiente y presión atmosférica (Devinny *et al.*, 1999).

Los métodos biológicos se han aplicado en el tratamiento de efluentes o contaminantes gaseosos a través de tecnologías como la biofiltración, que se asemeja a la fermentación en medio sólido (FMS) ya que en ambos casos se tiene un soporte sólido, al cual se adhiere una capa de microorganismos, una fase líquida donde ocurren fenómenos de transferencia de masa y una fase gaseosa que en la FMS aporta solamente oxígeno y en el caso de la biofiltración proporciona, además, la fuente de carbono y energía para los microorganismos, ver tabla 1 (García-Peña, 2002).

**Tabla 1.** Semejanzas entre la fermentación en medio sólido y la biofiltración

Fase	FMS	Biofiltración
Sólida	Soporte (en algunos casos contiene nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos).	
Líquida	Unida a la matriz sólida, en esta fase ocurren fenómenos de transferencia de masa	
Gaseosa	Aporte de O <sub>2</sub>	Aporte de O <sub>2</sub> , Fuente de carbono y energía

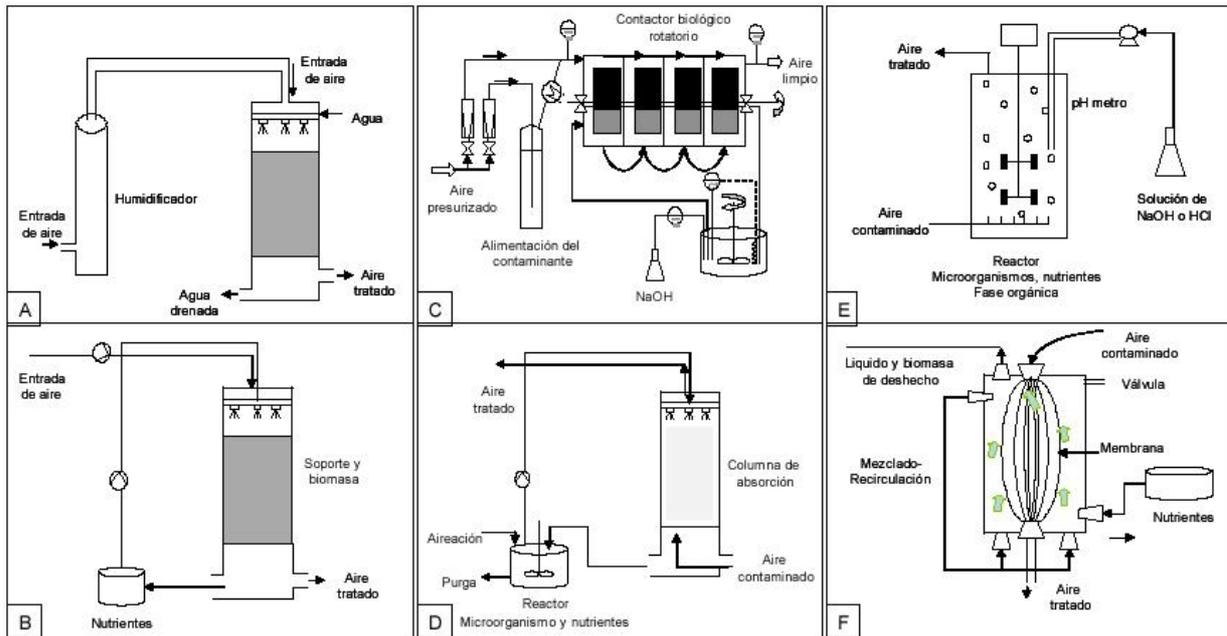
La biofiltración se puede definir como un proceso mediante el cual aire o gases contaminados se hacen pasar a través de un reactor, en el cual se encuentran fijos a un soporte microorganismos (levaduras, bacterias u hongos), los cuales degradan los compuestos orgánicos contaminantes, transformándolos en compuestos más simples (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>S, S<sup>0</sup>, <sup>-</sup>SO<sub>4</sub>, <sup>-</sup>NO<sub>3</sub>). Una fracción de los compuestos orgánicos contaminantes pasa a formar parte del nuevo material celular (Ottengraf, 1983; van Lith, 1986; Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

Aunque su aplicación industrial es reciente, la biofiltración ha sido utilizada para abatir olores en plantas de tratamiento de aguas residuales, basureros, procesadoras de alimentos, industrias de aromas y sabores; en la actualidad existen sistemas para el tratamiento de COV's derivados de las industrias de pinturas, fotografía, plásticos y síntesis química. Entre otras aplicaciones se han instalado sistemas para el tratamiento de las emisiones de suelos contaminados, gasolineras, campanas de extracción y en la obtención de productos de valor agregado empleando sustratos gaseosos (García-Peña, 2002; Meza *et al.*, 2005).

Las principales configuraciones de los reactores biológicos para el tratamiento de aire contaminado se clasifican de acuerdo a la forma en que se encuentra la biomasa y la fase líquida (ver tabla 2). Estas son: a) biofiltros, b) biofiltro de lecho escurrido, c) contactores biológicos rotatorios d) biolavador, e) reactor de dos fases, f) biorreactores de membrana. Los cuales se presentan esquemáticamente en la figura 1 (Ottengraf, 1983; Arriaga, 2005a).

**Tabla 2.** Características generales de los reactores empleados para el tratamiento de aire contaminado (Arriaga, 2005a).

Reactor	Biomasa	Fase líquida
a) Biofiltro	Fija sobre un soporte	Estacionaria
b) Biofiltro de lecho escurrido	Fija sobre un soporte	Fluyendo
c) Contactores biológicos rotatorios	Fija sobre un soporte	Semi-estacionaria
d) Biolavador	Suspendida	Fluyendo
e) Reactor de dos fases	Suspendida o fija	Estacionaria
f) Biorreactores de membrana	Fija sobre una membrana	Fluyendo



**Figura 1.** Principales configuraciones de reactores empleados para tratar aire contaminado (Arriaga, 2005a).

### 2.1.2.2 Hongos filamentosos en biofiltros

Las principales poblaciones microbianas que se emplean en los biofiltros son bacterias, sin embargo es frecuente la proliferación de hongos filamentosos en estos sistemas. A diferencia del amplio conocimiento que se tiene de las bacterias, los hongos han sido escasamente estudiados y solo han sido utilizados a nivel experimental en sistemas de biofiltración.

Durante estudios realizados por el grupo de investigación de Biotecnología Ambiental para el Tratamiento de Aire Contaminado de la UAM-I, se observó el crecimiento de una cepa fúngica en un biofiltro operado con vapores de tolueno (Morales y col., 1998). La colonización del biofiltro con dicha población predominante llevó al aislamiento y posterior identificación del hongo *Paecilomyces variotti*. De modo similar se aisló de un biofiltro alimentado con vapores de gasolina al hongo *Fusarium solani*. Recientemente ha surgido especial interés en los hongos filamentosos, debido a que se ha demostrado que pueden mejorar la remoción de compuestos orgánicos volátiles levemente hidrofóbicos. Actualmente el grupo ha llevado a cabo estudios de los sistemas de biofiltración empleando hongos para la remoción de contaminantes.

Estudios con hongos aislados de biofiltros expuestos a vapores de gases contaminados con COV's han demostrado la asimilación de éstos como única fuente de carbono y energía. Algunos hongos filamentosos reportados por degradar hidrocarburos en fase gas son: *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Cladophialophora* spp. *Exophiala* spp., *Rhinochadiella* spp. y *Fusarium* spp. (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2005).

Algunos autores aseveraban que la asimilación de hidrocarburos está ampliamente extendida en el reino de los hongos; sin embargo sus conclusiones, estuvieron basadas enteramente en la observación del crecimiento de los hongos en agar expuesto a vapores de hidrocarburos. Tales estudios pueden ser vulnerables a arrojar resultados positivos falsos, ya que los microorganismos pueden crecer utilizando sustancias de reserva almacenadas en el inóculo inicial, y/o impurezas contenidas en el agar (Randall

y Hemmingsen, 1994). Fue hasta mediados de los 80's que Fedorak y Westlake (1986) demostraron inequívocamente que ciertos hongos asimilaban hidrocarburos aromáticos. Ellos hicieron esto creciendo cultivos axénicos en botellas cerradas, monitoreando la disminución del sustrato, acumulación de intermediarios y la formación de biomasa. De muestras de agua marina contaminadas con petróleo, obtuvieron cuatro cepas (identificadas como *Paecilomyces* spp, *Verticillium* spp, *Beauveria* spp y *Penicillium* spp) que fueron capaces de crecer con cadenas largas de alquilbenceno como única fuente de carbón y energía (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2005).

Una década después Cox *et. al* (1993, 1997) aislaron a los hongos *Exophiala jeanselmei*, *Clonostachys rosea*, y *Penicillium* spp., de biofiltros alimentados con aire contaminado de estireno. La asimilación de tolueno fue también demostrada con estos aislados utilizando sistemas cerrados para crecerlos. Estos resultados han incitado el desarrollo de biofiltros basados en el uso de hongos filamentosos como biocatalizadores para la purificación de aire contaminado con hidrocarburos. Consecuentemente, el número de cepas de hongos aisladas de sistemas alimentados con hidrocarburos volátiles se ha incrementado en años recientes (Weber *et al.*, 1995; Prenafeta Boldú *et al.*, 2001; Woertz *et al.*, 2001; Kennes y Veiga, 2004). García-Peña *et al.*, (2001) reportaron capacidades de eliminación (CE) para el tolueno seis veces superiores utilizando el hongo *Paecilomyces variotti* que las usualmente reportadas cuando se usan bacterias. Para el hexano, que es aproximadamente 100 veces menos soluble que el tolueno, Spigno *et al.*, (2003) reportaron CE entre 100 y 150 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> mientras que las reportadas para un consorcio bacteriano solamente han sido entre 10 y 60 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>. Arriaga *et al.*, 2005b aislaron dos cepas de hongos *Cladosporium* sp y *Fusarium solani*, de un biofiltro que trataba gasolina sintética. Obteniendo en experimentos cortos CE de hexano de 40 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> para *Cladosporium* sp y CE de hexano de 50 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> *Fusarium solani*. Posteriormente Arriaga *et al.*, (2005c) reportaron que el sistema inoculado con *Fusarium solani* podía mantener en promedio CE de 90 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> con una máxima de 130 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>.

Es importante resaltar que las bacterias tienden a crecer rápidamente en medio acuoso, donde los hongos, especialmente los hongos filamentosos, crecen lentamente y, en general, poco adaptados para crecer en sustratos líquidos. Sin embargo en los biofiltros, los organismos crecen sobre un soporte donde el agua libre es escasa y los sustratos son provistos vía la fase gas. El desarrollo de los hongos es particularmente favorecido por la relativa baja actividad de agua y también por la acidificación del sistema, resultado de la actividad biológica (Cox *et al.*, 1993; Prenafeta Boldú *et al.*, 2001; Kennes y Veiga, 2004). Recientemente Vergara-Fernández *et al.*, (2006) reportaron la disminución del coeficiente de partición de hexano gaseoso y un aumento en la hidrofobicidad superficial de *Fusarium solani* al crecer con hexano en medio sólido. Estos procesos han sido poco estudiados para la producción de compuestos con valor agregado, Meza *et al.*, (2005) propusieron la deslignificación de bagazo de caña y la producción simultánea de lacasa utilizando el basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 en un reactor de fase gas.

## **2.2 Biodegradación de sustratos hidrofóbicos por hongos**

La degradación de materia orgánica por hongos puede ser considerada indeseable si se desea preservar el material que es atacado por ellos. Pero en los ciclos de la naturaleza, en donde lo que muere debe ser degradado para que los ciclos de la vida continúen, su papel es vital. Algunos trabajos realizados con hongos entomopatógenos, sobre la degradación de los hidrocarburos cuticulares de insectos, sugieren que es una ruta metabólica importante utilizada por los hongos para la producción de energía (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo, 1990). En relación al tratamiento de la contaminación ambiental por hidrocarburos, la cantidad de literatura disponible sobre bacterias, ha sido documentada desde 1946, y excede a la literatura disponible para hongos. Esto parecería sugerir que la asimilación directa de hidrocarburos es poco frecuente en hongos. Sin embargo diversos trabajos han demostrado que los hongos son capaces de utilizar a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2005).

### 2.2.1 Degradación de compuestos cuticulares por hongos

La infección fúngica de los hongos se inicia previa adhesión y penetración a través de la cutícula del organismo huésped. Las ceras cuticulares son normalmente una mezcla compleja de diversos tipos de compuestos alifáticos donde cada uno de ellos puede contener varias series homólogas de compuestos. La cantidad y tipo de los distintos componentes presentes en las ceras cuticulares es realmente amplia, hidrocarburos alifáticos, cetonas, alcoholes secundarios, monoésteres, poliésteres, alcoholes primarios, aldehídos, ácidos carboxílicos, terpenos y esteroides Napolitano y Juárez (1997) reportan que la degradación de los hidrocarburos cuticulares de insecto, es una ruta metabólica importante para la producción de energía. Estudios posteriores con hongos entomopatógenos, donde se utiliza un medio sintético enriquecido con hidrocarburos de similar longitud a los presentes en la cutícula de los insectos (n-hexadecano, n-octacosano y n-tetracosano), demuestran que estos hongos, son capaces de transformar algunas estructuras de hidrocarburos en diversos productos lipídicos (ácidos grasos libres, fosfolípidos y acilgliceroles), parte de los cuales pueden ser utilizados posteriormente para la producción de energía y la biosíntesis de componentes celulares (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo, 1990).

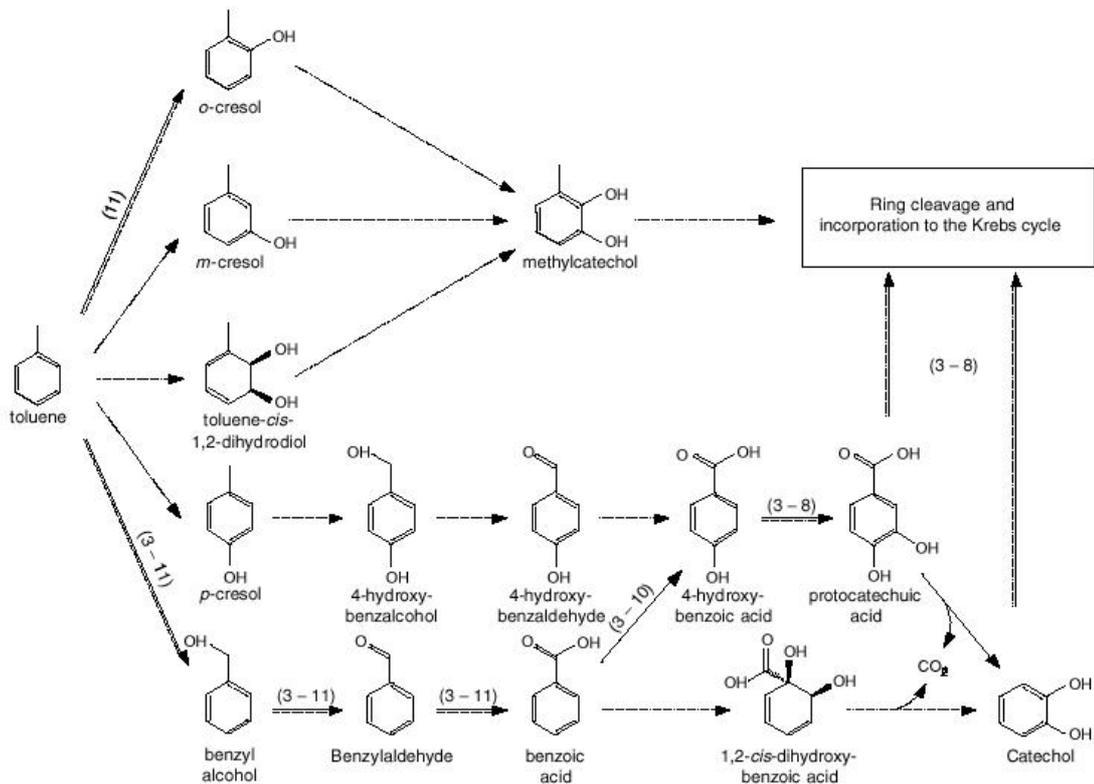
Se ha reportado que el crecimiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en medios suplementados con alcanos, incrementa su virulencia contra sus insectos huésped (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo *et al.*, 2002). *Lecanicillium lecanii* ha sido reportado como productor de quitinasas en cultivos líquidos y sólidos (Matsumoto *et al.*, 2004). Marín (2006), evalúa la actividad quitinolítica y expresión de hidrofobinas de cepas de *Lecanicillium lecanii* en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles.

### 2.2.2 Degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por hongos

En general, los hongos tienen tres maneras de metabolizar hidrocarburos, cada una involucra su propio mecanismo enzimático: (1) reacciones parciales de transformación, (2) degradación completa en presencia de un segundo sustrato compatible; y (3) asimilación directa del hidrocarburo como única fuente de carbono y energía. El modo preferido en investigaciones de biorremediación es la asimilación directa de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía especialmente cuando el resultado es una completa mineralización. En relación a este tópico, la cantidad de literatura disponible sobre bacterias, ha sido documentada desde 1946, y excede a la literatura disponible para hongos (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2005).

Existen varias rutas metabólicas involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos en los hongos. Como ejemplo, el primer compuesto que se forma durante la metabolización del tolueno en condiciones aerobias por el hongo *Paecilomyces* sp. es la formación del alcohol bencílico, y tras una serie de pasos formar catecol, posteriormente formar el cis-muconato, 2-hidroxi-muconicsemialdehído, compuestos que se unen al Acetil-CoA formando Succinil-CoA y finalmente son mineralizados hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O ver figura 2 (García-Peña *et al.*, 2005).

Existen muchos compuestos en la naturaleza que son químicamente inertes, como es el caso de los alcanos que son moléculas desprovistas de oxígeno. Algunos microorganismos tienen la habilidad de catalizar reacciones de oxidación usando el oxígeno molecular, a partir de esto se inician secuencias de reacciones que llevan a establecer las rutas catabólicas. El primer paso durante la metabolización de los alcanos en condiciones aerobias es la formación de un alcohol secundario, y tras una serie de pasos formar ácido acético y ácido carboxílico, los cuales entran a la  $\beta$ -oxidación (Dagley, 1975; van Beilen *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Principales rutas metabólicas para la asimilación aeróbica de tolueno conocidas en hongos (líneas continuas) comparadas con las de bacterias (líneas punteadas) después compuestas por Holland *et al.* (1993); Cox 1995; Weber *et al.* (1995) ; Prenafeta Boldú *et al.* (2001) y O’Leary *et al.* (2002) Los números en cada ruta asocian al hongo que lleva a cabo la transformación.

La pronunciada diferencia en los niveles de conocimiento acerca del metabolismo bacteriano de hidrocarburos y el fúngico, se puede deber a que tradicionalmente se han empleado los cultivos líquidos para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos especializados, además de la tendencia de seleccionar bacterias por su mayor velocidad de crecimiento (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2005).

## 2.3 Hidrofobicidad superficial de hongos filamentosos

Los microorganismos son capaces de interactuar con una gran variedad de superficies que van desde materiales inorgánicos naturales y artificiales como rocas y plásticos, hasta los tejidos de las plantas y los animales. La hidrofobicidad superficial de los microorganismos es una propiedad que influye en la adherencia a superficies, y en los fenómenos de transporte en medios heterogéneos (Loosdrecht *et al.*, 1987; Gannon *et al.*, 1991). La pared celular constituye el sitio inicial de interacción entre el hongo y el medio ambiente en el que se encuentra, por ser la estructura más externa de las células fúngicas, desempeñando importante papel en los procesos de adherencia, migración, colonización e invasión de los tejidos animales, así como en la adhesión a superficies inertes. La adhesión a tejidos o superficies inertes depende de enlaces de tipo electrostático, en los que juega un papel importante la hidrofobicidad de la pared celular del hongo. Las células hidrofóbicas se adhieren más fácilmente a los tejidos, y además presentan una mayor resistencia a la fagocitosis que las células con superficie hidrofílica, favoreciendo incluso la captación de algunas sustancias del medio (Macura, 1987; Hazen y Hazen, 1988; Ener y Douglas, 1992; Braun, 1994)

Durante los últimos años, el interés por el estudio del papel de la hidrofobicidad de la superficie celular en los fenómenos de adherencia de los hongos tanto a tejidos animales como a materiales inertes ha sufrido un notable aumento, debido principalmente al desarrollo de métodos simples y económicos para determinar y/o cuantificar dicha propiedad en estos microorganismos, así como al hecho de las evidencias experimentales obtenidas en sistemas bacterianos en los cuales ha sido descrito que la hidrofobicidad de la superficie celular juega un papel muy importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos. La hidrofobicidad de la superficie celular en algunos hongos es un proceso dinámico y rápido, ya que las células pueden modificar el carácter de su superficie (de hidrofílico a hidrofóbico y viceversa) en períodos de tiempo no superiores a 30 minutos (Hazen y Hazen, 1988).

En general, la superficie de las hifas es fuertemente hidrofóbica independientemente del estatus que posea la célula a partir de la cual se ha originado dicha hifa, observación que es cosubstancial con el mayor carácter invasivo que aparentemente se ha atribuido al micelio. De manera paralela a lo que ocurría en el caso de las bacterias, los estudios iniciales sobre la adhesión de hongos al huésped se encaminaron hacia la caracterización de los componentes presentes en la superficie de las células fúngicas (adhesinas) de las que depende la capacidad para adherirse a las células huésped, sugiriéndose que determinadas especies manoproteicas de la superficie (pared) celular del hongo, podrían desempeñar ese papel, así como que la parte proteica de dichas manoproteínas tendría una mayor importancia que el componente carbohidrato de las mismas a la hora de mediar en la adherencia del hongo a las células del huésped (Beachey, 1981; Sobel *et al.*, 1981).

Se ha sugerido que las modificaciones que se producen en la pared celular durante la transición morfológica, confieren a las hifas características particulares (adhesión, hidrofobicidad, etc.) que pueden ser responsables de una mayor virulencia (Cannon *et al.*, 1994; Soll, 1990). Además de las manoproteínas, existen otras moléculas directa o indirectamente relacionadas con la estructura y/o composición de la pared celular que parecen desempeñar también una función importante en la interacción y posterior adherencia de hongos a los tejidos del hospedador, tal es el caso de compuestos de naturaleza lipídica, enzimas proteolíticas extracelulares, etc. En este sentido, parece estar encaminadas las hidrofobinas, una nueva familia de proteínas descrita en hongos entomopatógenos, micopatógenos y fitopatógenos. Las hidrofobinas están involucradas en la absorción pasiva de esporas o hifas a superficies hidrofóbicas, en los pasos iniciales de la patogénesis fúngica, donde los hongos necesitan adherirse a la superficie hidrofóbica del huésped antes de que pueda ocurrir la penetración y posterior infección, así como en la formación de estructuras aéreas hidrofóbicas como son el micelio y cuerpos fructíferos. (Wösten 2001; Wessels 1997).

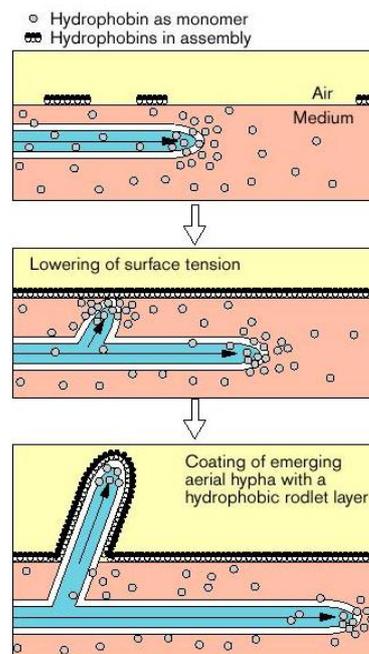
## 2.4 Hidrofobicidad, biosurfactantes e hidrofobinas

El agua es un compuesto polar. Disuelve fácilmente a la mayoría de los compuestos iónicos o polares, también denominados hidrofílicos (del griego, “amantes del agua”). Por el contrario los compuestos apolares (hidrofóbicas del griego “miedo al agua”) interfieren las interacciones agua-agua por lo que son muy poco solubles en la misma. En soluciones acuosas, estas moléculas tienden a agruparse para minimizar los efectos energéticamente desfavorables de su presencia. Los gases biológicamente importantes tales como el CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> son apolares. La polaridad de un compuesto esta definida por la constante dieléctrica, la cual es una medida de las propiedades de un solvente para mantener cargas opuestas separadas y esta relacionada con el momento dipolar total de cada una de las moléculas. En su valor influyen el peso molecular, la forma de la molécula, la dirección de sus enlaces o el tipo de interacciones que presente. Los compuestos polares como el agua ó etanol tienen una elevada constante dieléctrica (80 y 24 respectivamente), por el contrario, en los compuestos no polares como el tolueno (2.3), hexano (1.9) ó aire (1) es relativamente pequeña (Lehninger, 1995; Shriner, 1997).

Los surfactantes son moléculas que tienen una parte hidrofílica y una hidrofóbica. La naturaleza anfipática de las moléculas surfactantes provoca que se acumulen en las interfaces (ej. agua-aire, aceite-agua, agua-sólido). Los biosurfactantes son una clase de surfactantes producidos por una amplia variedad de organismos vivos desde microorganismos y plantas (e.j. saponinas) hasta organismos superiores incluyendo el cuerpo humano (e.j. sales biliares). (Healy et al., 1996; Lin 1996). Los surfactantes microbianos son un grupo heterogéneo de diferentes estructuras químicas tales como glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos, lípidos neutros, ácidos grasos y complejos proteína-polisacáridos. Una característica única de los biosurfactantes es su capacidad de auto-ensamblarse en la interfase hidrofóbica-hidrofílica capaces de modificar las propiedades de los sólidos y estabilizar burbujas de gas y gotas de aceite en agua. Se ha sugerido que este tipo de moléculas, permiten aumentar la biodisponibilidad de compuestos

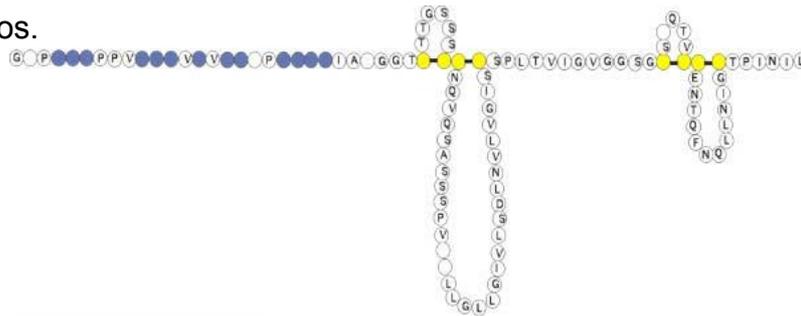
hidrofóbicos al influir en la transferencia de masa interfacial (Lehninger, 1995; Sabatini *et al.*, 1994; Lin, 1996; Desai y Banat, 1997; Bognolo, 1999).

Como ya se mencionó los hongos filamentosos al estar naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, presentan características fisiológicas interesantes, como son la formación de micelio aéreo y superficies hidrofóbicas (ver figura 3). Ambas características se encuentran relacionadas con la producción de proteínas de pequeño tamaño molecular (longitud  $100 \pm 25$  amino ácidos), moderadamente hidrofóbicas, exclusivas de hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos), con actividad surfactante, llamadas hidrofobinas, implicadas en la absorción de esporas o hifas a superficies hidrofóbicas y en la formación de estructuras aéreas hidrofóbicas como son el micelio y cuerpos fructíferos, también poseen gran importancia en los pasos iniciales de la patogénesis fúngica, donde los hongos necesitan adherirse a la superficie hidrofóbica del huésped antes de la penetración y posterior infección donde los hongos necesitan adherirse a la superficie hidrofóbica del huésped antes de que pueda ocurrir la penetración y posterior infección. En otros casos las hidrofobinas tienen funciones en casos de simbiosis entre hongos y plantas (Raymond *et al.*, 1998; Scherrer y Onno 2000; Wösten y Willey, 2000; Pedrós-Marí 2003).



**Figura 3.** Formación de hifa aérea de hongos filamentosos (Wösten *et al.*, 2000)

Las hidrofobinas son abundantes proteínas fúngicas que han recibido una considerable atención en años recientes (Wessels J. G. 1997). Las hidrofobinas se caracterizan por tener un patrón conservado de ocho residuos de cisteína, incluyendo dos dobles de cisteínas (ver figura 4). El nombre hidrofobina fue originalmente introducido debido al alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Wessels *et al.*, 1991b). A la fecha, más de 70 genes de hidrofobinas han sido aislados de hongos de las especies ascomicetos y basidiomicetos.



**Figura 4.** Cadena de aminoácidos característica de las hidrofobinas (Zangi *et al.*, 2002).

Las hidrofobinas se han dividido en dos clases basándose en el patrón hidrofóbico y la solubilidad de la proteína ensamblada. Las películas formadas por hidrofobinas clase I son altamente insolubles, y solo pueden estar disociadas en monómeros empleando agentes tales como ácido fórmico y ácido trifluoroacético (TFA) concentrado. En contraste las hidrofobinas clase II son menos estables, pudiendo emplear etanol al 60% o SDS al 2% para disociar las películas formadas por esta clase de hidrofobinas.

#### **Hidrofobinas clase I**

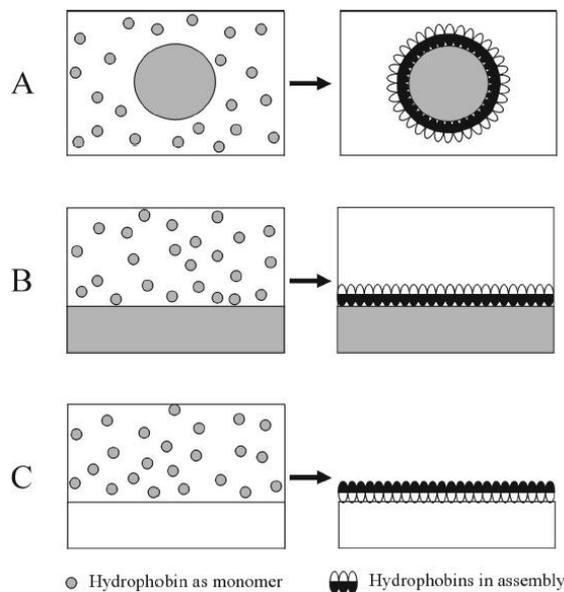
- Secuencia de aminoácidos con baja homología
- Más conocidas
- Más abundantes
- Ascomicetos y Basidiomicetos
- Disociadas por ácido fórmico y ácido trifluoroacético
- Formación de “Rodlets”

#### **Hidrofobinas clase II**

- Secuencia de aminoácidos conservada
- Menos conocidas
- Menos abundantes
- Ascomicetos
- Disociadas por SDS y etanol
- No forman “Rodlets”

La propiedad característica de las hidrofobinas es el autoensamble interfacial que puede ocurrir entre agua y aire, una pared celular hidrofílica y aire o agua y un sólido hidrofóbico (Wessels, 1997; Wösten, 2001). Esta propiedad permite cambiar la naturaleza de las superficies, convirtiendo superficies hidrofóbicas en hidrofílicas y superficies de naturaleza hidrofílica en hidrofóbicas (ver figura 5) (Scholtmeijer *et al.*, 2001).

Los Rodlets son el producto del autoensamblaje de monómeros de hidrofobinas clase I, algunos trabajos sugieren que las capas de rodlets generan las superficies hidrofobicas que recubren a los hongos, la disrupción del gen Rod A de *Aspergillus nidulans* y del gen Eas de *Neurospora crassa* da lugar a mutantes con esporas fácilmente mojables, al perder la capa hidrofobica de rodlets que recubren el conidio. Aun no se sabe si los rodlets se componen únicamente de hidrofobinas, la presencia de sitios de miristilación en la hidrofobina Eas de *Neurospora crassa* y la homología a las proteínas de lípidos en plantas sugiere que interacciones lipídicas podrían estar implicadas en la producción de las capas de rodlets o en su unión a la pared celular subyacente (Pedrós-Marí 2003)



**Figura 5.** Ensamble de hidrofobinas y formación de membranas antipáticas. (Scholtmeijer *et. al* 2001)

Aprovechando su principal característica para cambiar las propiedades biofísicas de una superficie, las hidrofobinas podrían ser empleadas para adherir moléculas a superficies por las que normalmente no se tiene afinidad, ej. inmovilización de células o proteínas a superficies, así como la inmovilización de anticuerpos en biosensores. El nivel de la actividad superficial de las hidrofobinas puede compararse con los surfactantes sintéticos y otros biosurfactantes comerciales. Por lo tanto pueden emplearse como agente dispersante en diferentes ramas de la industria. Encontrando utilidad para suspender soluciones oleosas lo que se aprovecha en los sistemas para la administración de fármacos. Las hidrofobinas tienen la ventaja de ser biodegradables además de no mostrar toxicidad, citotoxicidad o inmunogenicidad, ya que normalmente son ingeridas por humanos en las setas o alimentos que provienen de las fermentaciones donde se emplean hongos (Theo *et al.*, 2003; Scholtmeijer y Wessels, 2001; Askolin *et al.*, 2001; Wösten 2001).

Algunas de las aplicaciones potenciales de las hidrofobinas requieren de grandes cantidades ( $\text{g L}^{-1}$ ). Sin embargo para algunas otras aplicaciones sólo se requieren pequeñas cantidades, por ejemplo para cubrir  $1 \text{ m}^2$  de teflón es suficiente  $1 \text{ mg}$  de hidrofobina clase I (Askolin *et al.*, 2001). Hasta el momento la producción de hidrofobinas se ha limitado a lotes pequeños los cuales sólo son suficientes para aplicaciones a pequeña escala como son dispositivos médicos y biosensores. Aunque algunas hidrofobinas han sido estudiadas intensamente los experimentos sólo se han concentrado en los aspectos biológicos de las proteínas y no en su producción. En lo que respecta a la producción de estas proteínas, los hongos filamentosos que naturalmente secretan hidrofobinas al medio son considerados buenos candidatos de estudio (Scholtmeijer *et al.*, 2001; Askolin *et al.*, 2001). Se reporta que una cepa salvaje de *Schizophyllum commune* secreta cantidades por arriba de los  $60 \text{ mg}$  de hidrofobinas clase I por litro de medio de cultivo, lo cual hace a *Schizophyllum commune* el mayor productor de esta clase de proteínas reportado a la fecha. Intentos para producir hidrofobinas en *Escherichia coli* y *Hansenula polymorpha* no han sido satisfactorios ya que sólo se han logrado producir muy bajas cantidades ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Scholtmeijer *et al.*, 2001; Askolin *et al.*, 2001).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivos general

Estudiar la respuesta fisiológica (hidrofobicidad superficial y producción de hidrofobinas) de hongos filamentosos al crecer con sustratos gaseosos de diferente grado de hidrofobicidad.

### 3.2 Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de hongos entomopatógenos y micopatógenos para consumir sustratos gaseosos hidrofóbicos.
- Establecer la técnicas para la extracción y caracterización de hidrofobinas del hongo *Rhinoctadiella similis*.
- Determinar la hidrofobicidad superficial del hongo *Rhinoctadiella similis*, al crecer en un ambiente hidrofóbico y un hidrofílico
- Extraer y caracterizar las hidrofobinas producidas por el hongo *Rhinoctadiella similis* al crecer en un biofiltro alimentado con un sustrato hidrofobico (hexano), y compararlas con las producidas en un biofiltro alimentado con un sustrato hidrofílico (etanol).

## 4. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha demostrado que los hongos pueden mejorar la remoción de compuestos hidrofóbicos en biofiltros. Las poblaciones fúngicas presentan varias ventajas en los biofiltros debido a su capacidad para tolerar bajos pH's y  $A_w$ , lo cual es común en tales sistemas. Se ha sugerido que la gran eficiencia obtenida en los biofiltros fúngicos puede estar relacionada con la hidrofobicidad de las hifas aéreas, las cuales están en contacto directo con el gas y podrían absorber los compuestos hidrofóbicos más rápido que las biopelículas bacterianas planas. Los hongos filamentosos por estar naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, presentan características fisiológicas interesantes como son la formación de micelio aéreo lo que ofrece altas relaciones de área superficial, y superficies hidrofóbicas que probablemente incrementen el transporte de compuestos hidrofóbicos. recientes (Weber *et al.*, 1995; Prenafeta *et al.*, 2001; Woertz *et al.*, 2001; Kennes y Veiga, 2004; García-Peña *et al.*, 2001). Ambas características se encuentran relacionadas con la producción de hidrofobinas, proteínas de bajo peso molecular involucradas en la absorción pasiva de esporas o hifas a superficies hidrofóbicas, y en los pasos iniciales de la patogénesis fúngica, así como en la formación de estructuras aéreas hidrofóbicas como son el micelio y cuerpos fructíferos (Wösten 2001; Wessels 1997).

En el presente estudio nos interesa evaluar la capacidad de hongos conocidos por su aplicación en biocontrol para consumir sustratos gaseosos hidrofóbicos. Además de probar, si la respuesta fisiológica de los hongos filamentosos al crecer con sustratos gaseosos hidrofóbicos, será un aumento en la hidrofobicidad superficial del hongo, y si el ambiente hidrofóbico estimula la producción de hidrofobinas, proteínas necesarias para que el hongo pueda desarrollarse en estas condiciones. Lo anterior con el fin de buscar algún tipo de correlación entre la producción de estas proteínas y la hidrofobicidad superficial del hongo al crecer en un biofiltro. Y establecer un primer estudio sobre la utilización de biofiltración fúngicos para tratar corrientes gaseosas contaminadas con hidrocarburos y obtener algún producto con valor agregado como pueden ser las hidrofobinas.

## 5. HIPÓTESIS

- La hidrofobicidad superficial del hongo será mayor al crecer en un ambiente hidrofóbico, que en un ambiente hidrofílico.
- La producción de hidrofobinas será en un biofiltro alimentado con un sustrato hidrofobico (hexano), que en el biofiltro alimentado con un sustrato hidrofílico (etanol).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Microorganismos

Se utilizan las cepas fúngicas *Fusarium solani* y *Rhinochadiella similis*, aisladas de un biofiltro que trataba gasolinas sintéticas, operado durante 2 años donde las poblaciones predominantes eran hongos y bacterias (Hernández-Flores 2002; Arriaga y Revah 2005c) y que en estudios posteriores demostraron ser capaces de degradar hidrocarburos en fases gas con diferente grado de hidrofobicidad, como: fenol, tolueno y hexano (Arriaga *et al.*, 2006). También se evalúa la capacidad para consumir hexano o tolueno en dos cepas conocidas por su uso en biocontrol, *Lecanicillium lecanii* 991 y *Trichoderma harzianum*, ambas cepas proporcionadas por el laboratorio de biopolímeros de la UAM-I. Las principales características de las cepas utilizadas para el estudio se muestran en la tabla 3:

**Tabla 3.** Principales características de las cepas seleccionadas para el estudio (Theo *et al.*, 2003; Arriaga *et al.*, 2005; García-Peña *et al.*, 2005; Marín 2006; Vergara-Fernández *et al.*, 2006).

Hongo	Consumo de hidrocarburos	Producción Hidrofobinas	Hidrofobicidad superficial (método de la gota)	Uso en el experimento
<i>F. solani</i>	Fenol, tolueno y hexano	No reportado	> 60° ángulo de contacto	Control de consumo de tolueno y hexano
<i>R. similis</i>	Fenol, tolueno y hexano	No reportado	No reportado	Control de consumo de tolueno y hexano
<i>L. lecanii</i> 991	Actualmente el laboratorio de biopolímeros de la UAMI realiza estudios al respecto		No reportado	Evaluación
<i>T. harzianum</i>	No hay reportes	Qid3 y SrH1	< 30° ángulo de contacto	Evaluación

### 6.2 Soporte inerte

Se utiliza como soporte inerte un material de origen volcánico conocido como perlita o agrolita, físicamente estable, químicamente inerte, sin contaminantes, ni sales, de baja densidad y pH neutro. Muy utilizada como soporte para experimentos de biofiltración (Cox *et al.*, 1997; Kibazohi *et al.*, 2004). La densidad aparente del material es de 0.116 g cm<sup>-3</sup>, con una fracción vacía de 0.64, absorción máxima de agua de 2.73 g<sub>agua</sub> g<sub>perlita</sub><sup>-1</sup> y un tamaño de partícula de 4.1 mm. El material fue esterilizado a 120°C y 15 psi, durante 15 min.

### 6.3 Medio mineral

El medio mineral utilizado en los microcosmos y columnas de biofiltración, es el reportado por Arriaga 2005a. En todos los casos se mantienen la misma composición de medio mineral, ajustando el tipo y concentración de la fuente de carbono. El medio fue esterilizado a 120°C y 15 psi, durante 15 min. La composición del medio mineral es: NaNO<sub>3</sub> 6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.38 g/L, CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.055 g/L y 4 ml/L de solución de elementos traza. La composición de la solución de elementos traza es: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.015 g/L, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.012 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.013 g/L, CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0023 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0015 g/L. El pH fue ajustado a 5.3.

### 6.4 Sustratos gaseosos

Como fuente de carbono y energía se emplearon hexano, tolueno y etanol. Sus principales características se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Características de los sustratos gaseosos propuestos para el estudio (Deviny *et al.*, 1999 Shriner, 1997).

Compuesto	Formula	Naturaleza química	Densidad	Coefficiente de Henry	*D	Biodegradabilidad
n-Hexano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Hidrocarburo alifático	0.66	74.13	1.9	Moderada
Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	Hidrocarburo aromático	0.87	0.275	2.3	Buena
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Alcohol primario	0.8	0.000257	24	Buena

\*D es la constante dieléctrica

### 6.5 Preparación del inóculo

Las cepas fueron recuperadas de viales, conservadas en glicerol (20% v/v) a 4°C. La propagación de las cepas se lleva a cabo en matraces de 250 mL con 30 mL de agar papa dextrosa (PDA), inoculados por estría e incubados a 30°C, durante 8 días. Posteriormente, las esporas fueron cosechadas de la superficie adicionando 20 mL de una solución Tween 80 (0.05% v/v), perlas de vidrio estériles y agitando suavemente. La suspensión de esporas se obtuvo por conteo en una cámara de Neubauer, diluyendo con medio mineral estéril para tener una concentración constante de esporas de 2x10<sup>7</sup> esporas ml<sup>-1</sup>.

## 6.6 Estudio de microcosmos (cultivo en lote)

Para evaluar el consumo del sustrato gaseoso en microcosmos. Se utilizaron botellas serológicas o matraces, sellados con válvulas de teflón (Mininert), para facilitar la inyección de sustrato y obtención de muestras, ver figura 6. Dentro de las botellas se colocó el soporte humedecido con medio mineral que contiene el inóculo a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Las botellas se incubaron a una temperatura de 30 °C. Para mantener el sistema con suficiente  $\text{O}_2$  disponible, se destapa el sistema en una campana de flujo laminar de 30 – 40 minutos, para permitir el intercambio de aire y eliminar el  $\text{CO}_2$  acumulado y se vuelve a poner el sustrato gaseoso.



**Figura 6.** Sistemas de microcosmos para determinar el consumo de sustratos gaseosos.

### 6.6.1 Controles de consumo de tolueno y hexano

*Rhinocladiella similis*: estos experimentos se realizaron con 2 g de perlita obtenidos de una columna de biofiltración inoculada con el hongo *Rhinocladiella similis*, alimentada durante 3 meses con vapores de hexano. En el tratamiento 1 y 2 *Rhinocladiella similis* se alimentó con hexano mientras que en el tratamiento 3 se cambió el sustrato por tolueno, el cual es un compuesto menos hidrofóbico que el hexano.

*Fusarium solani*: este experimento se realizó con 2 g de perlita obtenidos de una columna de biofiltración inoculada con el hongo *Fusarium solani*, alimentada durante 3 meses con vapores de hexano. En el tratamiento 1 y 2 *Fusarium solani* se alimentó con hexano mientras que en el tratamiento 3 se cambia el sustrato por tolueno, el cual es un compuesto menos hidrofóbico que el hexano.

Los sistemas utilizados anteriormente tanto los de *Rhinochlamydomonas* como los de *Fusarium solani*, fueron aireados y se le añadió medio mineral. Cada uno de los sistemas se alimentó con una mezcla de tolueno-hexano. Después de 96 horas se midió la cantidad de sustrato en el sistema. Este procedimiento se repitió una vez más, con la finalidad de asegurar la aclimatación a la mezcla tolueno-hexano. Posteriormente se volvió a airear y adicionar medio mineral a los cultivos, procediendo a monitorear el consumo tolueno-hexano y la producción de CO<sub>2</sub>, a fin de observar cual sustrato hexano o tolueno se consume primero al estar como una mezcla en el sistema.

### **6.6.2 Hongos entomopatógenos y micopatógenos evaluados para consumir tolueno y hexano**

*Lecanicillium lecanii* 991: el experimento se realizó con 2 g de perlita inoculada humedeciendo con 4ml de medio mineral que contenía el inóculo a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas ml<sup>-1</sup>. Se empleó salvado de trigo (1 g L<sup>-1</sup>) para acelerar la producción de biomasa, y posteriormente se adicionó el sustrato gaseoso hidrofóbico.

*Trichoderma harzianum*: el experimento se realizó con 2 g de perlita inoculada humedeciendo con 4ml de medio mineral que contenía el inóculo a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas ml<sup>-1</sup>. Se empleó salvado de trigo (1 g L<sup>-1</sup>) para acelerar la producción de biomasa, y posteriormente se adicionó el sustrato gaseoso hidrofóbico.

## **6.7 Estimación de tasa de consumo de hexano y etanol del hongo seleccionado**

Para determinar la velocidad de consumo de hexano se realizaron experimentos en lote, usando 2 g de perlita obtenida de una columna de biofiltración inoculada con el hongo, alimentada durante 3 meses con vapores de hexano. Se inyectaron 6  $\mu\text{L}$  de hexano líquido para tener una concentración teórica en la fase gas de  $27.54 \text{ g m}^{-3}$ , se toman muestras a través del tiempo para cuantificar la concentración del hexano y  $\text{CO}_2$  de la fase gas,

Para evaluar la velocidad de consumo de etanol, se realizaron experimentos en lote, usando 2 g de perlita humedecida con medio mineral que contiene el inóculo a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . El experimento se realizó con una concentración teórica en la fase gas de  $111.27 \text{ gm}^{-3}$ , a través del tiempo se tomaron muestras para cuantificar la concentración del etanol y  $\text{CO}_2$  presentes en la fase gas. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se analizaron como un promedio. Se graficó el consumo de sustrato en función del tiempo y los valores se ajustaron por medio del modelo de Gompertz mediante el software Origin versión 7.0 (OriginLab Corporation, 1991-2002). Del ajuste matemático se obtienen las velocidad de consumo máxima.

## **6.8 Experimentos en columnas de biofiltración escala laboratorio**

Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara de temperatura controlada a  $30^\circ\text{C}$ , se emplearon cuatro columnas de vidrio, empacadas con 20 g de perlita seca, inoculadas con 38 ml de medio mineral conteniendo el inóculo a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Aire saturado con hexano o etanol fueron mezclados con aire húmedo e introducidos por la parte inferior de las columnas a una velocidad de flujo de  $100 \text{ ml min}^{-1}$ , para tener un tiempo de residencia en el reactor de 1.7 min. La concentración de hexano y etanol a la entrada fue ajustada a  $5 \pm 1 \text{ g m}^{-3}$ .

### 6.9 Determinación de hidrofobicidad superficial de *R. similis*

Se prepararon matraces de rosca de 125 ml (Vol. útil de 150 ml) con 20 mL medio mineral conteniendo 15 g L<sup>-1</sup> de glucosa y 20 g L<sup>-1</sup> de agar noble. Se utilizaron membranas de tipo hidrofílicas (MF, Millipore, 0.45 μm, 47 mm diámetro) e hidrofóbicas (Durapore, Millipore, 0.45 μm, 47 mm diámetro). Se introdujeron en los matraces membranas de 1cm<sup>2</sup> previamente inoculadas por sumersión en una suspensión de esporas (2x10<sup>7</sup> esporas ml<sup>-1</sup>), los matraces fueron sellados con válvulas de teflón (Mininert), se adicionaron 5μL de hexano o etanol para tener un ambiente hidrofóbico o hidrofílico, se usó un control al cual no se adicionó ningún sustrato gaseoso. Posteriormente los matraces fueron incubados a 30°C, durante 8 días. Pasado este tiempo los sistemas fueron aireados en una campana de flujo laminar por 15 min y alimentados nuevamente con 5μL de hexano o etanol. Después de 12 días se sacaron las membranas y se determinó el ángulo de contacto colocando 1 μL de agua sobre la biopelícula formada e inmediatamente se tomó una fotografía, utilizado un microscopio Intel Qx3 conectado a una PC. El ángulo de contacto se midió usando el software Imagen 1.34s. El ángulo de contacto se determinó a superficies de vidrio, parafilm y teflón, los cuales fueron usados como controles. Usando el software NCSS 2001 se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados como un diseño de bloques completos al azar (DBCA), siendo los tratamientos hexano, etanol y glucosa, con el factor de bloqueo el tipo de membrana (hidrofóbica e hidrofílica) para saber si existe diferencia significativa en la respuesta a los diferentes tratamientos y si el tipo de membrana tiene algún efecto sobre la variable de respuesta. En caso de existir diferencia significativa se realizan la pruebas de Duncan y Tukey para encontrar las diferencias.



**Figura 7.** Medición de la hidrofobicidad superficial el método de la gota.

### **6.10 Determinación y caracterización de hidrofobinas**

La determinación de la producción de hidrofobinas, se realizó con micelio producido en agar en un ambiente hidrofóbico y del micelio producido en las columnas de biofiltración, alimentadas con etanol y hexano como única fuente de carbono y energía.

### **6.11 Producción de micelio en agar en ambiente hidrofóbico**

El micelio es producido en matraces de rosca de 125 ml (Vol. útil de 150 ml) , con 20 mL de medio mineral conteniendo 15 g L<sup>-1</sup> de glucosa y 20 g L<sup>-1</sup> de agar noble. Los matraces fueron inoculados con 0.1 ml de una suspensión de 2x10<sup>7</sup> esporas ml<sup>-1</sup> , los matraces fueron sellados con válvulas de teflón (Mininert), se adicionaron 5µL de hexano para mantener un ambiente hidrofóbico. Posteriormente fueron incubados a 30°C, durante 8 días. Pasado este tiempo los matraces fueron aireados en una campana de flujo laminar por 15 min y alimentados nuevamente con 5µL de hexano. Después de 15 días se llevó a cabo la extracción de hidrofobinas.

### **6.12 Extracción de hidrofobinas con ácido fórmico y SDS**

Las proteínas de las paredes del micelio fueron extraídas haciendo algunas modificaciones al método reportado por Ying y Feng (2004). El micelio producido en cada uno de los matraces fue suspendido en 10 ml de buffer Tris-HCl 100mM pH 9.0 conteniendo 2% de SDS. La suspensión se mantuvo en agitación constante y vigorosa durante 2 horas a temperatura ambiente, seguida por una centrifugación a 7740 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue dializado y liofilizado. El pellet se resuspendió en 3 ml de ácido fórmico concentrado frío (4°C), la suspensión se sonicó en un baño de agua helada 3 veces durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 7740 G por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se diluyó con 2.5 ml de agua deionizada, y neutralizó con una solución de NaOH al 45% (p/v) a 4°C, manteniéndola durante toda la noche a 4°C.

Las proteínas fueron separadas por centrifugación a 1380 g por 10 minutos a 4°C. El pellet se enjuagó 2 veces con una solución de isopropanol/agua 3:1 (v/v), se dializó y liofilizó. Ajustando los volúmenes requeridos y siguiendo el mismo método se extraen las proteínas del micelio producido en cada una de las columnas alimentadas con etanol y hexano.

### **6.13 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

Las muestras se prepararon disolviendo 50 mg de liofilizado en 50  $\mu$ L de agua deionizada, posteriormente se hizo una dilución 1:1 con buffer muestra. Se usó un estándar preteñido de amplio espectro Bio-Rad. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) por el método de Laemmli, bajo condiciones de reducción sobre un gel de concentración al 4% y un gel de separación al 15% corriendo a voltaje constante 150 V las muestras fueron reveladas con tinción de plata. Los resultados son registrados con una cámara digital KODAK Easy Share DX7590.

### **6.14 Análisis cuantitativo de la biomasa**

La cantidad de biomasa fue indirectamente determinado por el contenido de proteína a través del método de Bradford usando un kit Bio-Rad. El primer paso fue hacer una curva estándar de albúmina de suero bovino (ABS), la absorbancia se leyó con un espectrómetro (JENWAY 6305 Essex, UK) UV/Vis a una longitud de onda de 595 nm. La muestra se preparó pesando 2g de perlita molida y se adicionó 50 mL de NaOH 0.2M. La muestra se hirvió durante 15 min, se enfrió y se filtró. Posteriormente se tomó una alícuota de 200  $\mu$ L del filtrado, se adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford y 600  $\mu$ L agua destilada. Se agitó en un vórtex y se dejó reaccionar durante 15 min. Se preparó un blanco con 800  $\mu$ L solución NaOH 0.2 M y 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Se procedió a determinar la absorbancia a 595 nm. Las curvas de estándar utilizadas se muestran en el Anexo 1.

## 6.15 Cuantificación de proteína

La cantidad de proteína fue ensayada mediante el método de Bradford usando un kit Bio-Rad, usando albúmina de suero bovino (ABS) como estándar.

## 6.16 Análisis cuantitativo en fase gas

Se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones de cada uno de los sustratos gaseosos y de  $\text{CO}_2$  con una jeringa de precisión (VICI Precisión Sampling, Inc., EU), en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies serie 6890N) equipado con dos detectores uno de conductividad térmica (TCD) y el otro de ionización de flama (FID), registrando los tiempos de retención y área de los picos, para construir una curva estándar. Para medir el consumo de sustrato y la producción de  $\text{CO}_2$ , se tomaron muestras gaseosas de 100  $\mu\text{L}$  con una jeringa de precisión, y fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases. Las curvas de estándar utilizadas se muestran en el Anexo 1. Las condiciones de operación del cromatógrafo se muestran en la tabla 5:

**Tabla 5.** Condiciones de operación para medir la concentración de hexano, tolueno, etanol y  $\text{CO}_2$  en la fase gas.

	Hexano, Tolueno y Etanol	$\text{CO}_2$
Cromatógrafo de gases	Agilent Technologies serie 6890N	
Detector:	Ionización de flama (FID)	Conductividad térmica (TCD)
Columna:	Capilar AT™-WAX 25m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.20 $\mu\text{m}$ espesor de película	Columna empacada Poropack Q 80/100 (6' x 1/8" 55)
Gas acarreador:	Helio	
Flujo:	0.6ml/min	4.4ml/min
Temperatura Columna:	65°C	
Temperatura Inyector:	200°C	110°C
Temperatura Detector:	250°C	110°C
Software:	HPCORE ChemStation, GC ChemStation. Agilent Technologies 1990-2001	

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Evaluación del consumo de tolueno

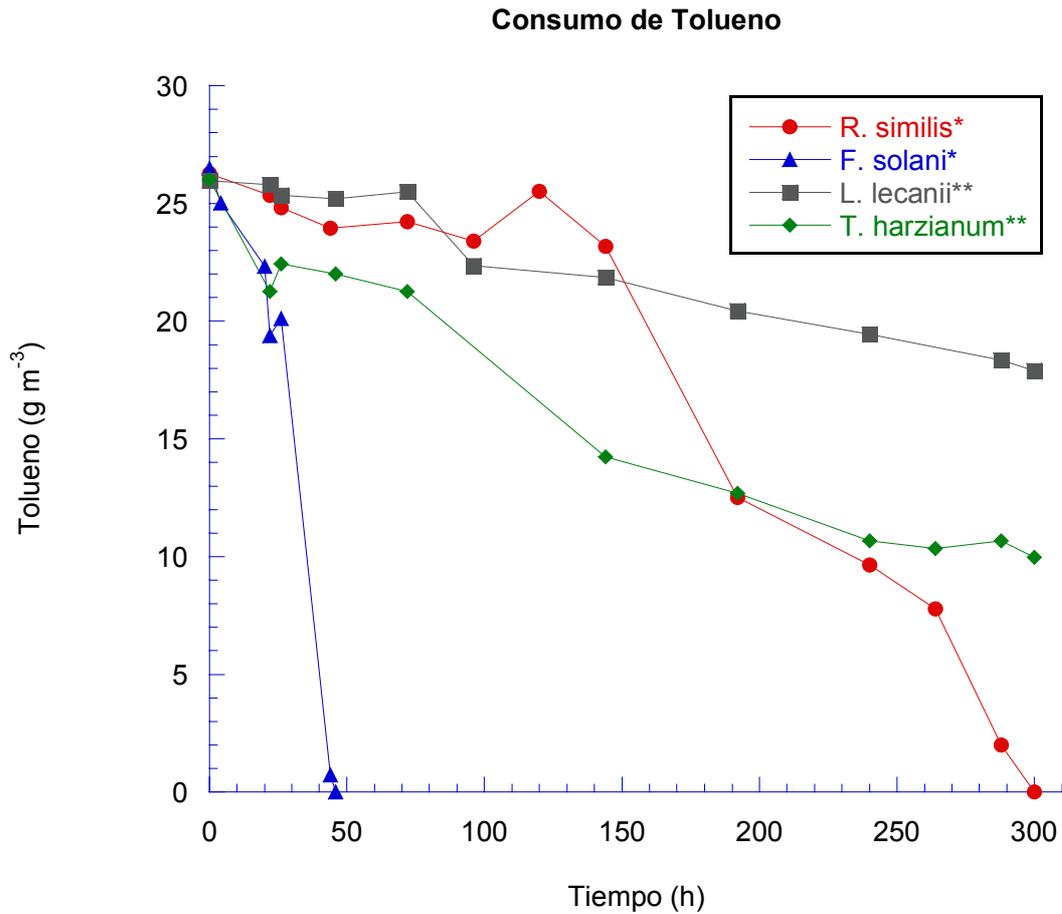
En las gráfica 1 se observa que los hongos evaluados *T. harziamun* y *L. lecanii* son capaces de consumir el tolueno, en la tabla 6 se muestra los porcentajes de consumo de tolueno los cuales fueron de 61.7% y 31% respectivamente en un tiempo de 300 horas. En cuanto a los porcentajes de consumo de tolueno para los controles se observa que *F. solani* fue capaz de consumir el 100% del tolueno en un tiempo de 46 horas, mientras que *R. similis* consumió el 100% del tolueno, esto nos sugiere que *F. solani* es capaz de cambiar en un menor tiempo que *R. similis* su metabolismo para poder consumir un sustrato menos hidrofóbico como lo es tolueno, sin embargo en este experimento no se cuantifico la biomasa por cual no es posible hacer una comparación de las velocidades de consumo al no ser específicas. Los porcentajes de mineralización para *R. similis* y *T. harzianum* fueron mayores al 100%, lo cual nos indica que existen otras fuentes de energía en el sistema como por ejemplo productos de la lisis celular, restos de salvado de trigo así como el propio metabolismo endógeno del hongo, el cual no fue evaluado en este experimento.

**Tabla 6.** Porcentajes de consumo de tolueno de *R. similis*, *F. solani*, *L. lecanii* y *T. harzianum* evaluado en microcosmos.

Hongo	Tolueno (25 g m <sup>-3</sup> )		
	% Consumo	% Mineralización	Tiempo (h)
<i>R. similis</i> *	100	109	46
<i>F. solani</i> *	100	89.5	300
<i>L. lecanii</i> 991**	31	43.8	300
<i>T. harzianum</i> **	61.7	126.3	300

\* Hongos obtenidos de columnas de biofiltración alimentadas durante 3 meses con vapores de hexano.

\*\* Se empleó salvado de trigo (1 g L<sup>-1</sup>) para acelerar la producción de biomasa, y posteriormente se adicionó el tolueno



**Gráfica 1.** Cinéticas de consumo de tolueno de los hongos *R. similis*, *F. solani*, *L. lecanii* y *T. harzianum*.

## 7.2 Evaluación del consumo de hexano

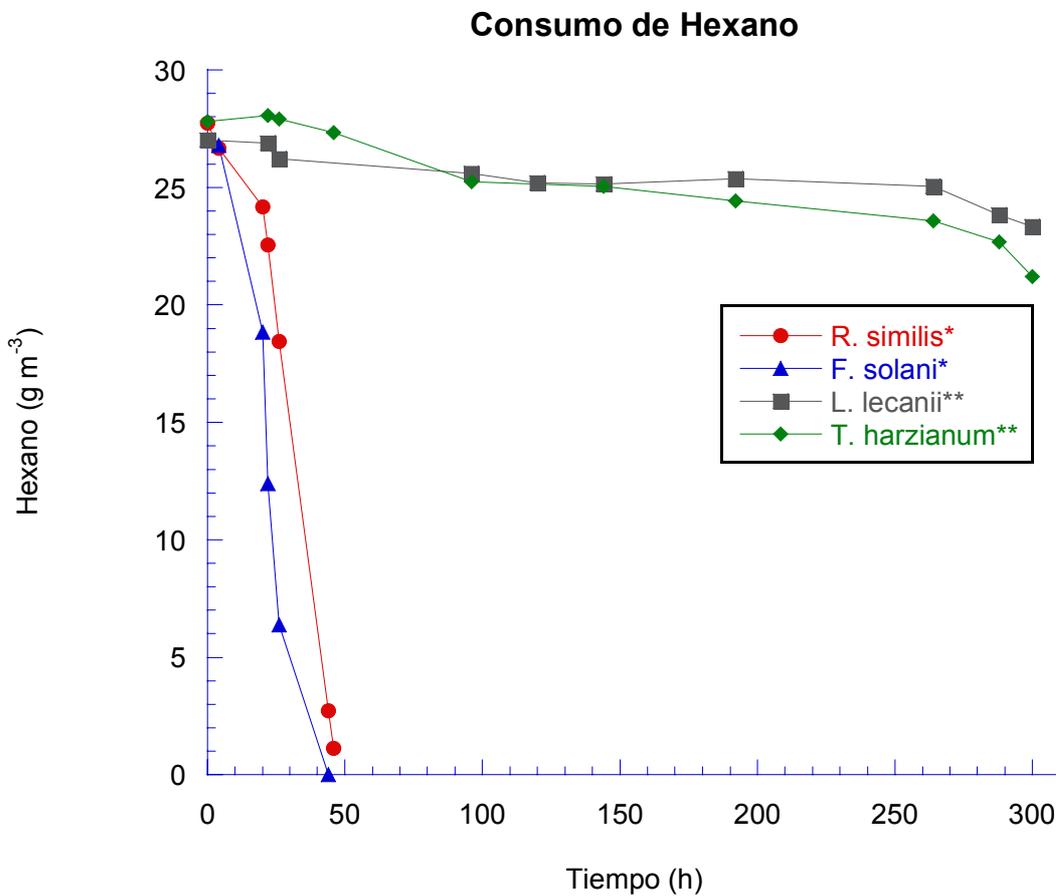
En la gráfica 2 se muestran los perfiles del consumo de hexano con respecto al tiempo. La tabla 7 muestra los porcentajes de consumo donde se observa el hexano consumido por *F. solani* y *R. similis* en aproximadamente 50 horas, fue del 100% y 96.1% respectivamente, mientras que en un tiempo de 300 horas el consumo para *T. harzianum* fue de 23.7% y para *L. lecanii* de 13.6%. Los porcentajes de mineralización para *R. similis* y *F. solani* estuvieron cercanos al 50%, mientras que para *T. harzianum* y *L. lecanii* fueron mayores al 100%, lo cual no sugiere que el CO<sub>2</sub> producido proviene del metabolismo endógeno del hongo.

**Tabla 7.** Porcentajes de consumo de hexano de *R. similis*, *F. solani*, *L. lecanii* y *T. harzianum* evaluado en microcosmos.

Hongo	Hexano (27 g m <sup>-3</sup> )		
	% Consumo	% Mineralización	Tiempo (h)
<i>R. similis</i> *	96	49,5	46
<i>F. solani</i> *	100	48,2	44
<i>L. lecanii</i> 991**	13.6	159,7	300
<i>T. harzianum</i> **	23.7	110,9	300

\* Hongos obtenidos de columnas de biofiltración alimentadas durante 3 meses con vapores de hexano.

\*\* Se empleó salvado de trigo (1 g L<sup>-1</sup>) para acelerar la producción de biomasa, y posteriormente se adicionó el hexano



**Gráfica 2.** Cinéticas de consumo de hexano de los hongos *R. similis*, *F. solani*, *L. lecanii* y *T. harzianum*.

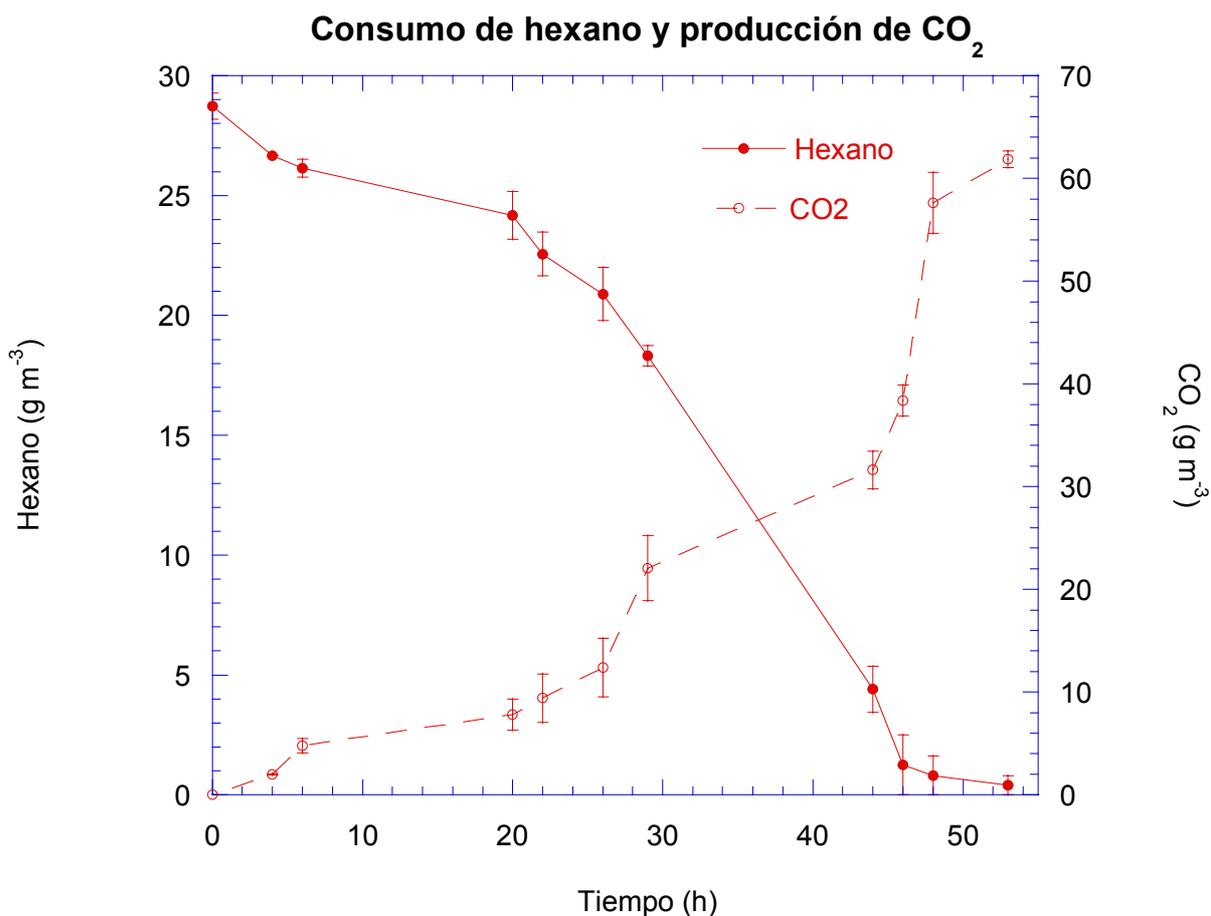
Los porcentajes de consumo de los sustratos gaseosos hidrofobicos (tolueno y hexano), obtenidos en el estudio en microcosmos, para los hongos *L. lecanii* 991 y *T. harzianum*, fueron menores a los obtenidos con los controles *R. similis* y *F. solani*. El consumo de tolueno fue mayor que el de hexano, *T. harzianum* fue capaz de consumir el 61.7% y *L. lecanii* el 31% de tolueno, mientras que el consumo de hexano fue de 23.7% y 13.6% respectivamente. Esto puede estar relacionado con la baja solubilidad del hexano, el cual es aproximadamente 100 veces menos soluble que el tolueno y su biodegradabilidad. Devinny *et al.*, (1999) reportaron la biodegradabilidad del hexano como moderada, mientras que para el tolueno la reportan como buena. En cuanto a los porcentajes de mineralización mayores al 100% se sugiere contar con controles negativos que permitan cuantificar el CO<sub>2</sub> producido proveniente del metabolismo endógeno o fuentes de energía presentes como contaminantes en el sistema.

### **7.3 Estimación de tasas de consumo de hexano y etanol de *R. similis***

Los experimentos para estimar la tasa de consumo de los sustratos gaseosos hexano y etanol se realizaron en microcosmo, determinando el consumo de sustrato y la producción de CO<sub>2</sub> en la fase gas.

#### **7.3.1 Cinética de consumo de hexano y producción de CO<sub>2</sub>**

En la gráfica 3 se muestra la cinética de consumo de hexano y producción de CO<sub>2</sub> del hongo *R. similis*, realizada con los datos promedio de dos experimentos. El hexano consumido por *R. similis* en un tiempo de 53 h fue de 98.6% con una mineralización del 71.2%. En el anexo 2 se muestran los datos del consumo de hexano en función del tiempo ajustados con el modelo de Gompertz, con los parámetros A y K del ajuste matemático se obtiene una velocidad de consumo máxima de  $0.0705 \text{ mg}_{\text{hexano}} \text{ g}_{\text{ss}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

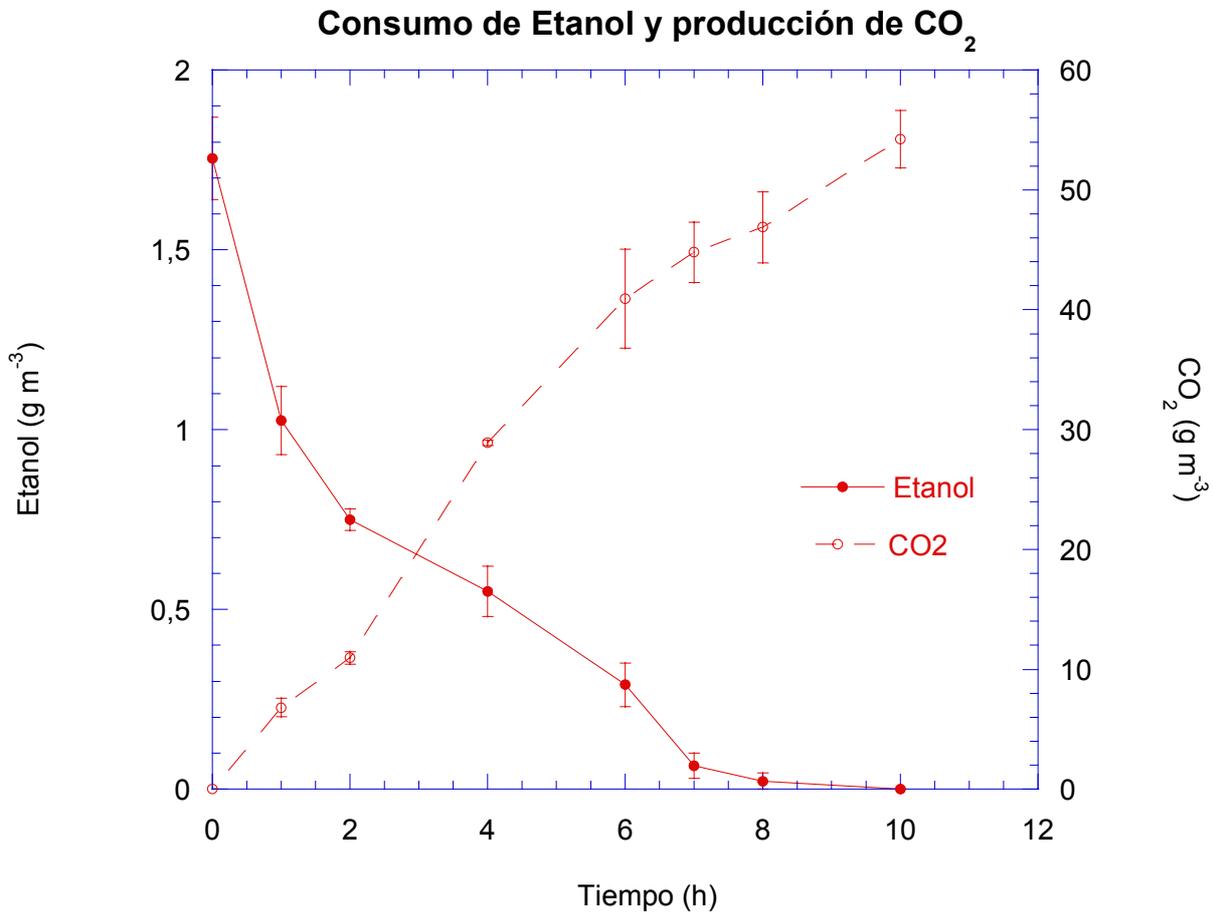


**Gráfica 3.** Cinética de consumo de hexano y producción de CO<sub>2</sub> del hongo *R. similis* en microcosmos

### 7.3.2 Cinética de consumo de etanol y producción de CO<sub>2</sub>

En la gráfica 4 se muestra la cinética de consumo de etanol y producción de CO<sub>2</sub> del hongo *R. similis*, realizada con los datos promedio de dos experimentos. El etanol consumido en fase gas por *R. similis* en un tiempo de 10 h fue de 100%. El bajo coeficiente de Henry del etanol implica que la mayor concentración de etanol se encuentre en la fase líquida, por lo tanto, la tasa de consumo de etanol se calcula ajustando los datos de producción de CO<sub>2</sub> con el modelo de Gompertz, por la estequiometría de reacción sabemos que por cada gramo de etanol consumido se producen 1.91 gramos de CO<sub>2</sub>, con esta relación y considerando que todo el etanol consumido es mineralizado, calculamos la tasa de consumo de etanol.

En el anexo 2 se muestran los datos de la producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo ajustados con el modelo de Gompertz, con los parámetros A y K del ajuste matemático se obtiene una velocidad de consumo máxima de 0.321 mg<sub>etanol</sub> g<sub>ss</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



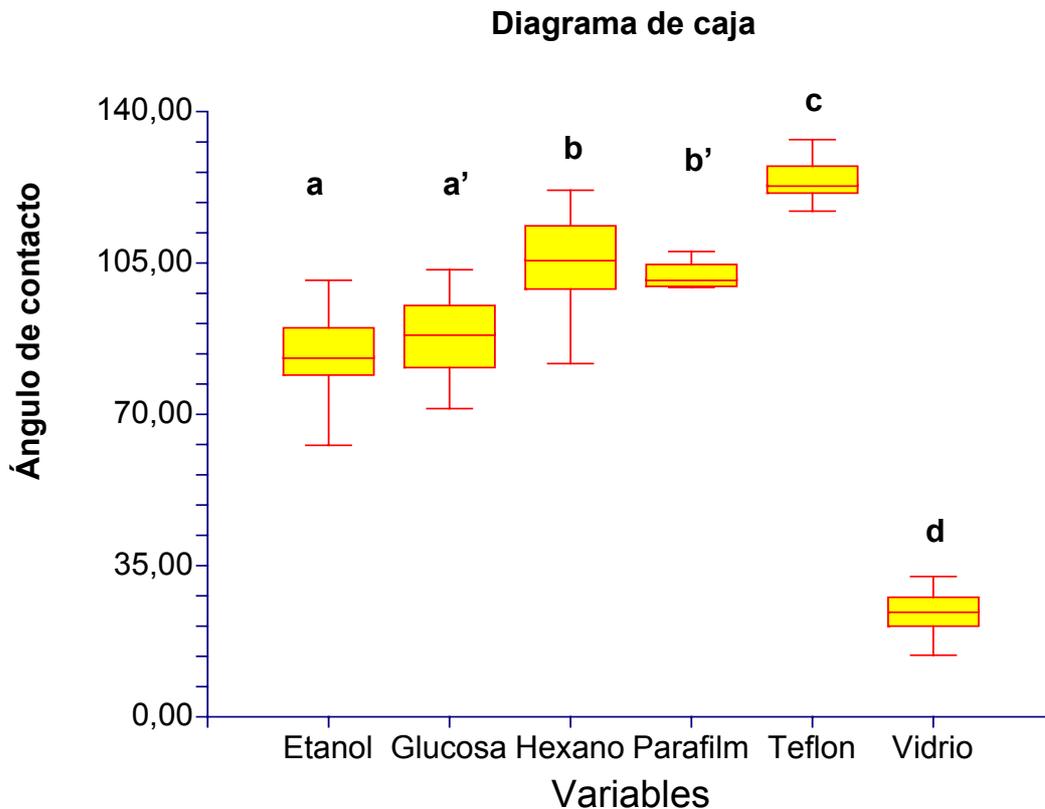
**Gráfica 4.** Cinética de consumo de etanol y producción de CO<sub>2</sub> del hongo *R. similis* en microcosmos

Se observa que la tasa de consumo de etanol es cuatro veces mayor que la de hexano lo cual puede ser explicado por el nivel de biodegradabilidad de los compuestos y sus propiedades fisicoquímicas. En cuanto a la biodegradabilidad el hexano al ser una molécula desprovista de oxígeno requiere primero ser oxidado, por lo tanto el primer paso durante la metabolización en condiciones aerobias es la formación de un alcohol secundario, y tras una serie de pasos formar ácido acético y ácido carboxílico, los cuales entran al ciclo de Krebs y β-oxidación (Dagley, 1975; van Beilen *et al.*, 2003).

Mientras que el etanol al ser un alcohol primario es fácilmente incorporado a la ruta metabólica de los microorganismos. Devinny *et al.*, (1999) han reportado la biodegradabilidad en biofiltros del hexano como moderada y la de etanol como buena. Respecto a las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, el coeficiente de Henry para el etanol es de 0.000257, con una constante dieléctrica de 24 lo que implica que la mayor parte del etanol se encuentra en la fase líquida, en donde se encuentra más biodisponible para los microorganismos, en contraste el coeficiente de Henry del hexano es 74.13 con una constante dieléctrica de 1.9 lo que implica que la mayor parte del hexano se encuentre en la fase gas donde se encuentra menos biodisponible. Algunos autores sugieren que una de las etapas que limita el proceso y que justifica las reducidas tasas de degradación para compuestos hidrofóbicos (van Groenestijn y Hesselink., 1993; Kennes y Veiga., 2001), es la baja transferencia de masa del contaminante de la fase gas a la fase líquida donde se encuentran los microorganismos.

#### **7.4 Hidrofobicidad superficial de *R. similis***

Se determinó la hidrofobicidad superficial por el método de la gota de *R. similis* al crecer en un ambiente hidrofóbico e hidrofílico. Mediante un análisis estadístico y aplicando la prueba de Tukey-Kramer la hidrofobicidad superficial del hongo al estar en un ambiente hidrofóbico (**b**) es similar a la del control abiótico parafilm (**b'**). Mientras que no se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en la hidrofobicidad del hongo al crecer con etanol (**a**) y el control de glucosa (**a'**), con ángulos de contacto promedio de 84° y 87° respectivamente (ver anexo 3). Estas diferencias también se pueden observar en el diagrama de caja (ver gráfica 5). Por lo tanto estos resultados sugieren que existe una diferencia significativa en la hidrofobicidad de *R. similis* al estar en un ambiente hidrofóbico encontrando ángulos de contacto promedio de 105°, que cuando se encuentra creciendo en un ambiente hidrofílico con ángulos de contacto promedio de 84°.



**Gráfica 5.** Diagrama de caja que muestra el ángulo de contacto como medida de la hidrofobicidad de *R. similis* creciendo en un ambiente: (a) hidrofílico con etanol, (a') control de glucosa, (b) hidrofóbico con hexano, (b') parafilm, (c) teflón y (d) vidrio.

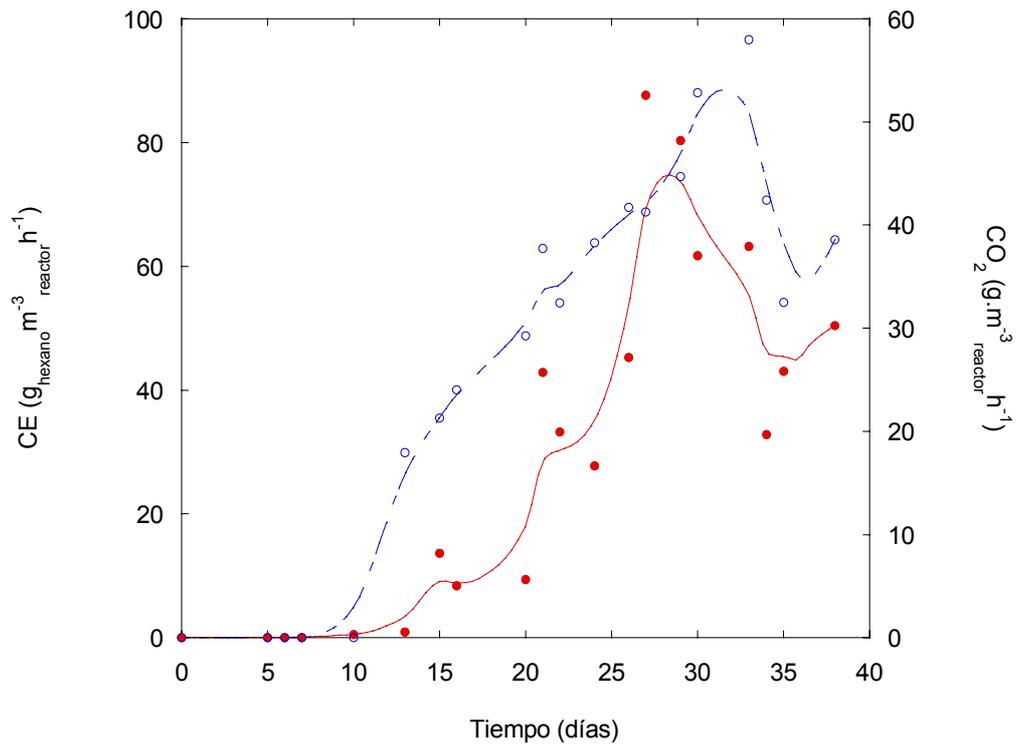
La hidrofobicidad superficial de los hongos depende del medio de cultivo en que crece, el estado fisiológico y la exposición al agua. Theo *et al.*, (2003) reportan ángulos de contacto entre  $107^\circ$  y  $100^\circ \pm 3^\circ$  para *Cladosporium sp* al crecer durante 18 días en diferentes medios de cultivo. Vergara-Fernández *et al.*, (2006) reportan ángulos de contacto de  $113^\circ$  cuando *Fusarium solani* creció con hexano en medio sólido y de  $75^\circ$  al crecer con glucosa.

## 7.5 Experimentos en columnas de biofiltración escala laboratorio

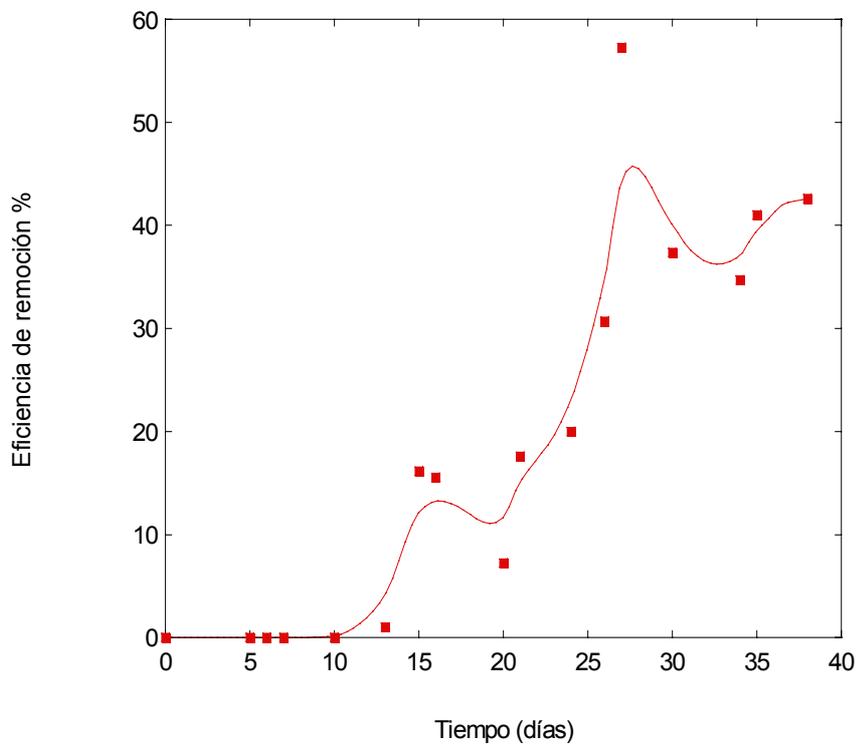
Se realizaron experimentos en columnas de biofiltración escala laboratorio, con el objeto de crecer al hongo utilizando hexano o etanol como única fuente de carbono, y posteriormente determinar la expresión de hidrofobinas en cada uno de los sistemas. La carga de hexano y etanol fue de  $168 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , y  $274 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  respectivamente, con un 10% de variación debida a las fluctuaciones en el flujo de aire ( $80 \pm 20 \text{ mL/min}$ ) a la entrada de las columnas. Se obtuvieron la CE sustrato, producción de  $\text{CO}_2$  y ER en función del tiempo de cada uno de los biofiltros con los datos promedio de dos muestra tomadas a la entrada y salida de los reactores.

### 7.5.1 Columnas de biofiltración alimentada con hexano

En la gráfica 6 se muestra la evolución del biofiltro alimentado con hexano, graficando la CE de hexano y la producción de  $\text{CO}_2$  en el tiempo. A partir del día 15, hasta el 38 la CE de hexano, y producción de  $\text{CO}_2$  se incrementaron simultáneamente hasta alcanzar valores de  $80$  y  $50 \text{ g m}^{-3}_{\text{reactor}}\text{h}^{-1}$ , con máximos de  $90$  y  $58 \text{ g m}^{-3}_{\text{reactor}}\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Se pueden observar tres picos en la CE y en la producción de  $\text{CO}_2$ , que corresponden con la adición de medio mineral, realizada en los días 13, 20 y 26. La eficiencia de remoción de hexano en función del tiempo se muestran en el gráfica 7, con un máximo del 57% a los 27 días.



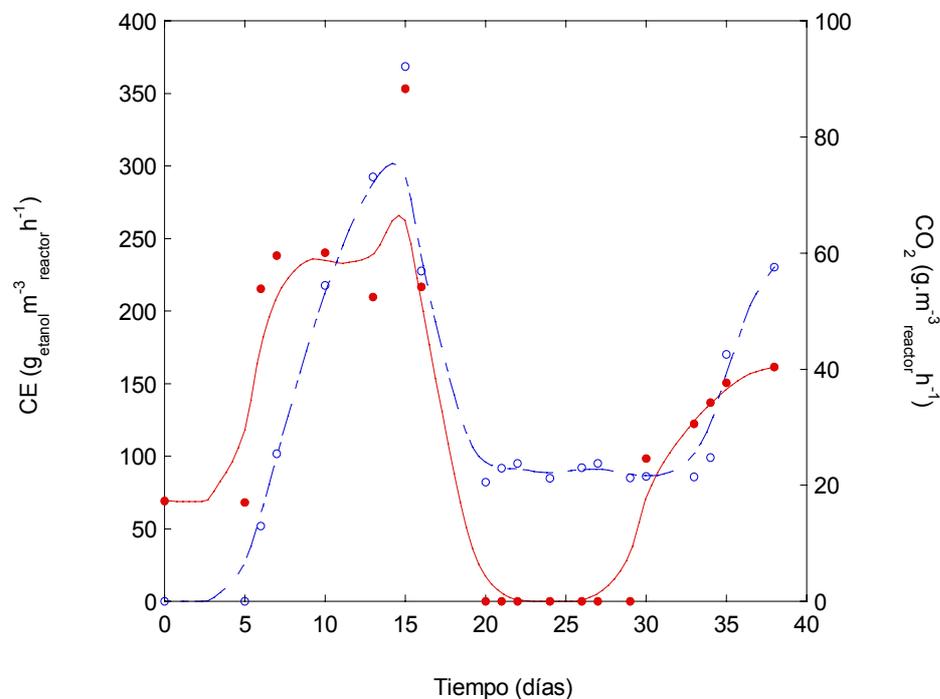
**Gráfica 6.** Evolución de la CE de hexano (■) y producción de CO<sub>2</sub> (○) en el tiempo, de *R. similis* en columna de biofiltración.



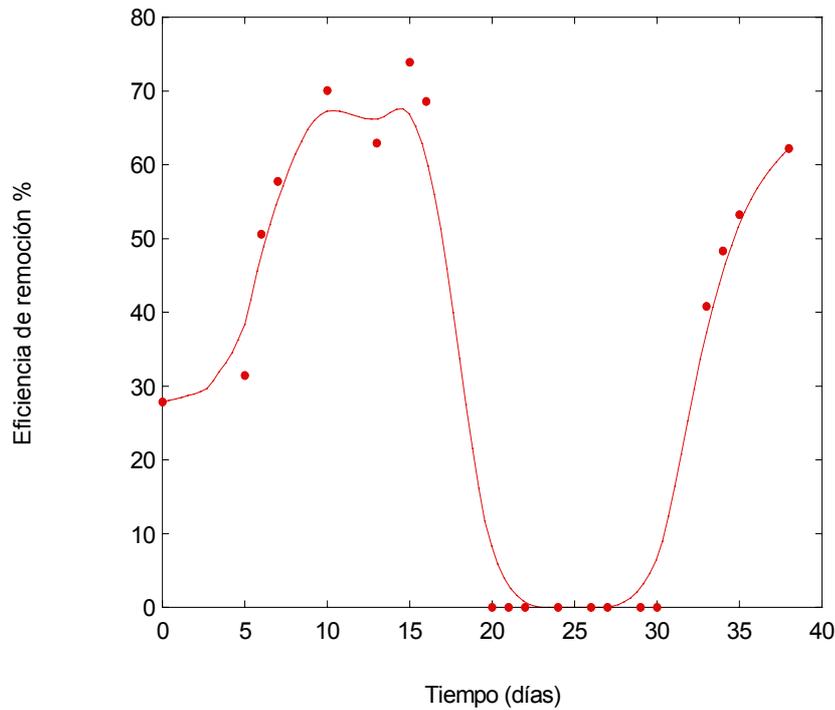
**Gráfica 7.** Eficiencia de remoción de hexano (■) en el tiempo, de *R. similis* en columna de biofiltración.

### 7.5.2 Columnas de biofiltración alimentada con etanol

En la gráfica 8 se muestra la evolución del biofiltro alimentado con etanol, graficando la CE de etanol y la producción de CO<sub>2</sub> en el tiempo. En los primeros 5 días se observó una aparente CE de 70 g m<sup>-3</sup> reactor h<sup>-1</sup>, sin embargo la producción de CO<sub>2</sub> no comenzó a aumentar sino hasta después del quinto día, esto pudo deberse a una etapa de absorción de etanol sobre la perlita húmeda. A partir del día 5, hasta el 16 la CE de etanol, y producción de CO<sub>2</sub> se incrementaron simultáneamente hasta alcanzar valores de 240 y 73 g m<sup>-3</sup> reactor h<sup>-1</sup>, con máximos de 353 y 92 g.m<sup>-3</sup> reactor.h<sup>-1</sup>, respectivamente. En el día 16 se observó una caída en la CE. Esto pudo deberse probablemente a inhibición por productos, taponamiento del reactor ó formación de zonas anaerobias, por lo que se decidió aumentar el flujo de entrada, logrando que aumentara nuevamente la CE de etanol, durante este periodo la producción de CO<sub>2</sub> se mantuvo constante, en 20 g m<sup>-3</sup> reactor h<sup>-1</sup> en promedio. En los días 13, 20, 26 y 34 se adicionó medio mineral al sistema, en la gráfica 8 se pueden observar algunos picos en la CE y en la producción de CO<sub>2</sub>, que corresponden con las primeras adiciones de medio mineral. La eficiencia de remoción de etanol en función del tiempo se muestran en la gráfica 9, con un máximo de 74% en el día 15.



**Gráfica 8.** Evolución de la CE de etanol (■) y producción de CO<sub>2</sub> (○) en el tiempo, de *R. similis* en columna de biofiltración.

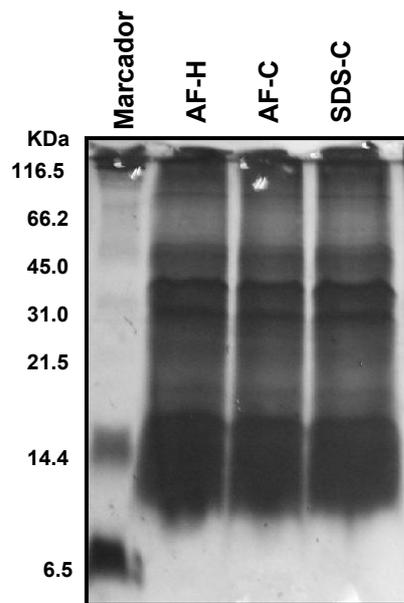


**Gráfica 9.** Eficiencia de remoción de etanol (■) en el tiempo, de *R. similis* en columna de biofiltración.

## 7.6 Determinación de la expresión de hidrofobinas

### 7.6.1 Expresión de hidrofobinas *R. similis* creciendo sobre agar en ambiente hidrofóbico

En la figura 8 se muestra el gel de la electroforesis, donde se observan tres bandas principales, la más densa con un peso molecular de 12 kDa, y las otras dos bandas de  $35.2 \pm 0.3$  kDa y  $29.8 \pm 0.2$  kDa (ver tabla 8). Consideramos como presuntas hidrofobinas a las proteínas de 12 kDa, ya que las hidrofobinas son proteínas de bajo peso molecular, extraíbles de la pared celular de los hongos con SDS al 2% y/o ácido fórmico concentrado.



**Figura 8.** SDS-PAGE con tinción de plata de proteínas extraídas con AF y SDS 2% de *R. similis* crecido en un ambiente hidrofóbico y un control de glucosa. **M:** Marcador de peso molecular. **AF-H:** Proteínas extraídas con AF de micelio crecido en ambiente de hexano. **AF-C:** Proteínas extraídas con AF de micelio control. **SDS-C:** Proteínas extraídas con SDS al 2% de micelio control.

**Tabla 8.** Peso molecular en kDa. **AF-H:** Proteínas extraídas con AF de micelio crecido en ambiente de hexano. **AF-C:** Proteínas extraídas con AF de micelio control. **SDS-C:** Proteínas extraídas con SDS al 2% de micelio control.

Peso molecular en kDa		
AF-H	AF-C	SDS-C
62,4	61,8	61,5
43,1	42,5	41,4
35,8	35,3	34,6
30,2	29,6	29,6
23,9	23,8	23,8
18,5	18,4	18,1
12,1	12,1	11,9

En cuanto al hongo creciendo en un ambiente hidrofóbico, no se observa una diferencia en el patrón de bandas de las proteínas extraídas con AF respecto a las extraídas con SDS al 2%, ni entre las extraídas de micelio crecido en ambiente de hexano respecto al control de glucosa. Es importante recordar que los gases que se encuentra en mayor proporción en el aire (CO<sub>2</sub>,

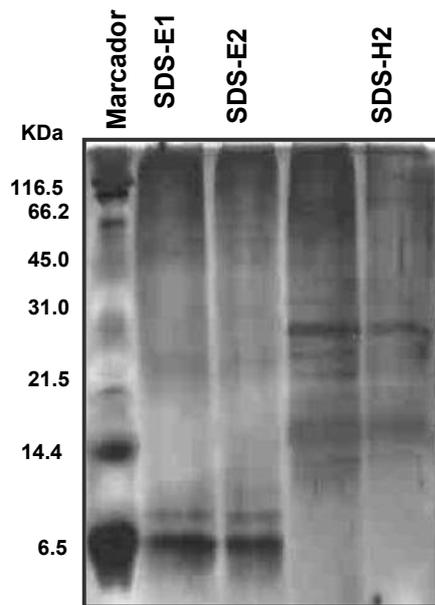
O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) son apolares, es decir de naturaleza hidrofóbica, lo cual podría ayudarnos a explicar el por que se obtiene el mismo patrón de bandas en los dos sistemas.

### **7.6.2 Expresión de hidrofobinas *R. similis* creciendo en columnas de biofiltración escala laboratorio en ambiente hidrofóbico e hidrofílico**

Se realizó la extracción de hidrofobinas con SDS al 2% ó ácido fórmico concentrado del micelio de *R. similis* crecido en columnas de biofiltración escala laboratorio alimentadas con hexano y etanol. Las muestras se prepararon para analizarlas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y reveladas con tinción de plata.

En el gel (no mostrado) de las proteínas extraídas con AF concentrado se revelaron un gran número de bandas, sin lograr observar diferencias en el patrón de bandas, posiblemente debido a la trituración de la perlita, lo cual pudo causar lisis celular y una un mayor liberación de proteínas, algunas de la cuales fueron extraídas con el AF concentrado.

En el caso del gel de las proteínas extraídas con SDS al 2% (ver figura 9) se observa claramente una diferencia en el patrón de bandas de las proteínas extraídas de la columna alimentada con hexano respecto a la columna alimentada con etanol. En las muestras de las proteínas extraídas de la columna alimentada con etanol, se pueden observar dos bandas principales, la primera de 8.5 kDa que corresponde a un  $3.05 \pm 0.3$  % de la proteína total colocada en el carril y la segunda de 7 kDa con un  $35,5 \pm 1.3$ % de proteína. Ambas proteínas se encuentran por debajo del peso molecular de las encontradas en la columna alimentada con hexano, en la cual se observan las bandas más densas en 15 kDa con  $27.3 \pm 1.3$  %, y 28.9 kDa con un  $18,06 \pm 4.7$ % de proteína. La cantidad de proteína colocada en los carriles corresponde a  $0.13 \pm 0.005$  µg de proteína/carril para los carriles E1 y H1, mientras que en los carriles E2 y H2 fue de  $0.10 \pm 0.01$  µg de proteína/carril.



**Figura 9.** SDS-PAGE con tinción de plata de proteínas extraídas con SDS 2% de micelio crecido en columnas de biofiltración. **M:** Marcador de peso molecular. **SDS-E:** Proteínas extraídas con SDS de micelio crecido con etanol. **SDS-H:** Proteínas extraídas con SDS de micelio crecido en hexano.

Lo que demuestra que las proteínas producidas por *R. similis* en un biofiltro con un sustrato hidrofílico (etanol) son diferentes a las producidas cuando consume un sustrato de características hidrofóbicas (hexano). Dichas proteínas podrían pertenecer a la familia de las hidrofobinas, proteínas con actividad surfactante de bajo peso molecular, moderadamente hidrofóbicas extraíbles con SDS al 2% y/o ácido fórmico concentrado, producidas exclusivamente por hongos filamentosos ascomicetos y basidiomicetos (Wessels, 1997; Wösten, 2001).

Las proteínas producidas en el sistema hidrofílico (8.5 kDa y 7 kDa) y que no se encontraron en el sistema hidrofóbico, podrían tratarse de hidrofobinas clase II las cuales son fácilmente dissociadas con SDS al 2%, y que parecen estar relacionadas con el crecimiento del hongo en ambientes acuosos al no formar rodlets. La disrupción de genes que codifican hidrofobinas clase I ha dado lugar a mutantes llamados fenotipo “fácilmente mojable”, al perder la capa hidrofóbica de rodlets que recubren la superficie del hongo. Lo que

sugiere que las estructuras de rodlets formadas por agregados de hidrofobinas clase I cubren y confieren hidrofobicidad a las superficies del hongo expuesta al aire. Protegiendo al hongo de la desecación manteniendo los canales que permiten el intercambio gaseoso en los cuerpos fructíferos. Sin embargo el significado de su patrón estructural es menos obvio. No se sabe con certeza si la capa de rodlets se compone únicamente de un tipo de proteína, ya que la presencia de más de una hidrofobina sugieren que las capas de rodlets pueden estar constituidas por agregados de más de un tipo de hidrofobina y/o proteína (Wessels, 1997; Wösten, 2001; Stringer and Timberlake, 1995; Lugones *et al.*, 1996; Wetter *et al.*, 2000).

Hasta el momento no se ha observado ninguna hidrofobina clase II formando rodlets, sin embargo esta clase de hidrofobinas también pueden formar estructuras ordenadas, se ha demostrado que la hidrofobina clase II CRP y CFTH1 de *C. parasitica* se une a la pared celular del hongo en fase líquida en ausencia de una interfase hidrofílica-hidrofóbica. También se han observado estructuras formadas por hidrofobinas clase II (CU CRP, HFBI y HFBI) estabilizando de una manera inusual burbujas de aire en soluciones acuosas (Carpenter *et al.*, 1992; Wösten and de Vocht, 2000)

## 8. CONCLUSIÓN

Los hongos *L. lecanii* y *T. harzianum*, ambos bien conocidos por sus aplicaciones como agentes de biocontrol y los cuales no han sido reportados por consumir sustratos gaseosos hidrofóbicos, fueron capaces de consumir tolueno y hexano, sin embargo los porcentajes de consumo fueron bajos comparados con *R. similis* y *F. solani* hongos extraídos de biofiltros. El consumo de tolueno fue mayor que el de hexano, *T. harzianum* fue capaz de consumir el 61.7% y *L. lecanii* el 31% de tolueno, mientras que el consumo de hexano fue de 23.7% y 13.6% respectivamente.

La hidrofobicidad superficial del hongo *R. similis* es mayor ( $>90^\circ$ ) al estar en un ambiente hidrofóbico generado por el hexano que al crecer en un ambiente hidrofílico con etanol ( $<90^\circ$ ). Lo cual podría estar correlacionado con el tipo de proteínas producidas durante su desarrollo.

Las expresión de proteínas del ascomiceto *R. similis* en un biofiltro con un sustrato hidrofílico (etanol) es diferente a las producidas cuando consume un sustrato de características hidrofóbicas (hexano).

Las proteínas producidas en el sistema hidrofílico (8.5 kDa y 7 kDa) y que no se encontraron en el sistema hidrofóbico, podrían tratarse de hidrofobinas clase II las cuales son fácilmente disociadas con SDS al 2%, y que parecen estar relacionadas con el crecimiento del hongo en ambientes acuosos al no formar rodlets. (Wessels, 1997; Wösten, 2001; Stringer and Timberlake, 1995; Lugones *et al.*, 1996; Wetter *et al.*, 2000).

No fue posible determinar en cual de los dos sistemas hay una mayor expresión de hidrofobinas, ya que existe una clara diferencia en la expresión de estas proteínas.

Se estableció el método para la extracción de proteínas de bajo peso molecular (presuntas hidrofobinas) del micelio de *R. similis* crecido sobre un soporte sólido en columnas de biofiltración.

## 9. PERSPECTIVAS

Como perspectivas del estudio se tiene la purificación y secuenciación de las presuntas hidrofobinas, pruebas de actividad superficial (tensión superficial y cambio de propiedades superficiales). Por otro lado establecer el método para la cuantificación de estas proteínas y la estandarización del método para determinar la hidrofobicidad superficial de los hongos, nos permitiría conocer si existe algún tipo de correlación entre la producción de estas proteínas y la hidrofobicidad superficial del hongo.

Aprovechando su principal característica para cambiar las propiedades biofísicas de una superficie las hidrofobinas podrían ser empleadas para adherir moléculas a superficies por las que normalmente no se tiene afinidad, ej. inmovilización de células o proteínas a superficies, así como la inmovilización de anticuerpos en biosensores. El nivel de la actividad superficial de las hidrofobinas puede compararse con los surfactantes sintéticos por lo tanto pueden emplearse como agente dispersantes en diferentes ramas de la industria (Scholtmeijer *et al.*, 2001).

La producción de hidrofobinas como un producto de valor agregado es un aspecto poco explorado. Ya que aun que algunas hidrofobinas han sido estudiadas intensamente, la mayoría de los trabajos solo se han concentrado en los aspectos biológicos de las proteínas y no en su producción (Theo *et al.*, 2003; Askolin *et al.*, 2001)

También faltan estudios acerca de las condiciones en las cuales se expresan cada clase o tipo de hidrofobina de hecho se sabe que los hongos expresan más de una hidrofobina en lugar de expresar una hidrofobina genérica, se ha sugerido que ello permitiría al hongo expresar hidrofobinas en diferentes estadios del desarrollo, o bien que cada una de las hidrofobinas tenga una función diferente. Una gran variedad de hongos contienen más de un gen que codifica para hidrofobinas. Tres genes de hidrofobinas han sido identificados en *Pleurotus ostreatus*, cuatro en *Schizophyllum commune* y en *Agaricus bisporus*. En *Cladosporium fulvum* han sido identificados seis genes

de hidrofobinas. (Wessels, 1997; Wösten, 2001; Stringer y Timberlake, 1995; Lugones *et al.*, 1996; Wetter *et al.*, 2000).

## 10. REFERENCIAS

- Arriaga S. 2005a.** Comparación del transporte y biodegradación de hexano entre bacterias y hongos con diferentes configuraciones de reactores. Tesis de doctorado.
- Arriaga S, Revah S. 2005b.** Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol Bioeng* 90: 107-115.
- Arriaga, S.; Revah, S. 2005c.** Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 32: 548–553.
- Arriaga S., Arellano M., Revah S. (artículo en revisión).** Biodegradation of phenol, toluene and hexane in gas phase by *Fusarium solani* and *Cladosporium sp.* Using wheat bran as an added growth substrate
- Ásgeirsdóttir, S. A., O. M. de Vries, and J. G. Wessels. 1998.** Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology* 144:2961-2969.
- Askolin S. Nakari-Setälä T. Tenkanen M. 2001.** Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 124-130.
- Braun PC. 1994.** Surface hydrophobicity enhances corticosterone incorporation in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 62:4087-4090.
- Beachey EH. 1981.** Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143:325-345.
- Bolívar-Zapata F. 2002** (coordinador general). “Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI”. Retos y oportunidades. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. p. 187-207.
- Cannon, R. D., W. E. Timberlake, N. A. Gow, D. Bailey, A. Brown, G. W. Gooday, B. Hube, M. Monod, C. Nombela, F. Navarro, R. Pérez, M. Sánchez, and J. Plá. 1994.** Molecular, biological and biochemical aspects of fungal dimorphism. *J. Med. Vet. Mycol.* 32:53-64.
- Carpenter, C.E., Mueller, R.J., Kazmierczak, P., Zhang, L., Villalon, D.K. and van Alfen, N.K. 1992.** Effect of virus on accumulation of a tissue-specific cell surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, pp. 55-61.
- Cox HHJ, Houtman JHM, Doddema HJ y Harder W. 1993.** Enrichment of fungi and degradation of styrene in biofilters. *Biotechnol Lett* 15: 737–742.
- Cox HHJ, Moerman RE, van Baalen S, van Heiningen WNM, Doddema HJ, Harder W. 1997.** Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. *Biotechnol Bioeng* 53: 259-266.
- Cox HHJ. 1995.** Styrene removal from waste gas by the fungus *Exophiala jeanselmei* in a biofilter. PhD Thesis, University of Groningen, Groningen, the Netherlands.
- Crespo R, Juárez MP, Dal Bello GM, Padín S, Calderón G, and Pedrini N. 2002.** Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *Biocontrol* 47: 685-698.
- Dagley S. 1975.** Microbial degradation of organic compounds in the biosphere. *Am Sci* 63: 681-689.
- De Groot, P. W., P. J. Schaap, A. S. Sonnenberg, J. Visser, and L. J. Van Griensven. 1996.** The *Agaricus bisporus* hyphA gene encodes a hydrophobin

and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. *J. Mol. Biol.* 257:1008-1018.

**Deviny JS, Deshusses MA, Webster TS. 1999.** Biofiltration for Air Pollution Control, FL: Lewis Publishers/CRC. Press. p. 6-20.

**Ener B and Douglas LJ. 1992.** Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 78:37-42.

**Fedorak PM y Westlake DWS. 1986.** Fungal metabolism of n-alkylbenzenes. *Appl Environ Microbiol* 51: 435–437.

**García-Peña EI, Hernández S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S. 2001.** Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol Bioeng* 76:61-69.

**García-Peña I. 2002.** Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro. Tesis Doctorado.

**García-Peña I., Hernández S., Auria R., Revah S. (2005)** Correlation between biological activity and reactor performance in the biofiltration of toluene with the fungus *Paecilomyces variotii* CBS 115145. *Appl. Environm. Microbiol.* 71: 4280-4285

**Gannon JT, Manilal VB and Alexander M. 1991.** Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Appl Environ Microbiol* 57: 190–193.

**Hazen BW, Liebert RE and Hazen KC 1988.** Relationship of cell surface hydrophobicity to morphology of monomorphic and dimorphic fungi. *Mycologia* 80:348-355.

**Hernández-Flores AL. 2002.** Control de vapores de gasolina por biofiltración. Tesis de maestría.

**Holland HL, Kindermann M, Kumaresan S y Stefanac T. 1993.** Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi. Part 5. Exploring the Benzocyclic Hydroxylase of *Mortierella isabellina*. *Tetrahedron: Asymmetry* 4: 1353–1364.

**Lizuka M y Nicod C (2000),** Conciencia ciudadana y contaminación atmosférica: estado de situación en la ciudad de Santiago de Chile (LC/R.2022), Santiago de Chile, Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). p. 136-167.

**Kennes C y Veiga MC 2004.** Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J Biotechnol* 113: 305–319.

**Kershaw, M. J., and N. J. Talbot. 1998.** Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 23:18-33.

**Kibazohi O, Yun S, Anderson WA. 2004.** Removal of hexane in biofilters packed with perlite and a peat-perlite mixture. *World J Microb Biot* 20: 337-343.

**Lehninger, A. 1995.** Principios de bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. p. 81-88.

**Lema R. y Roca B. 1998.** Biorreactores no convencionales. En Ingeniería Bioquímica, Editorial Síntesis. pp. 189-214.

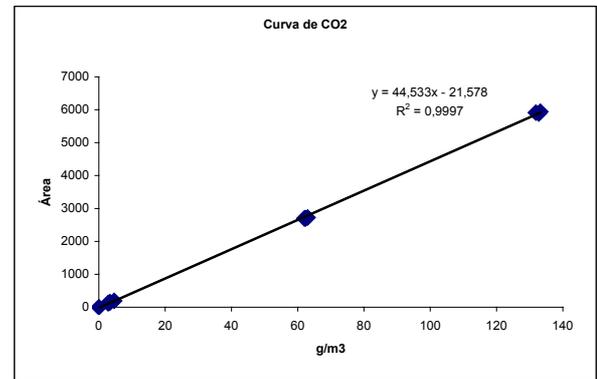
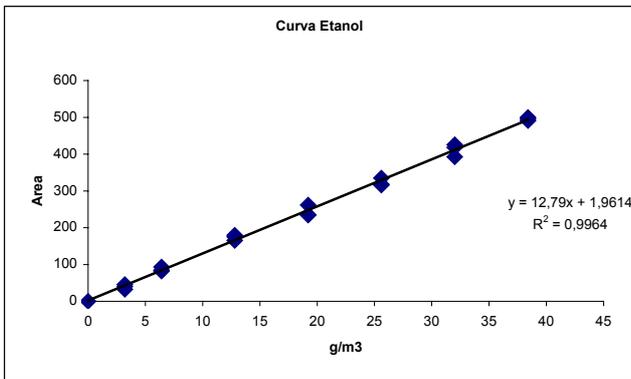
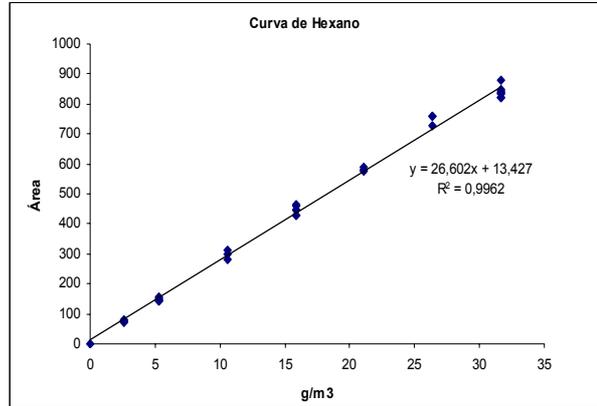
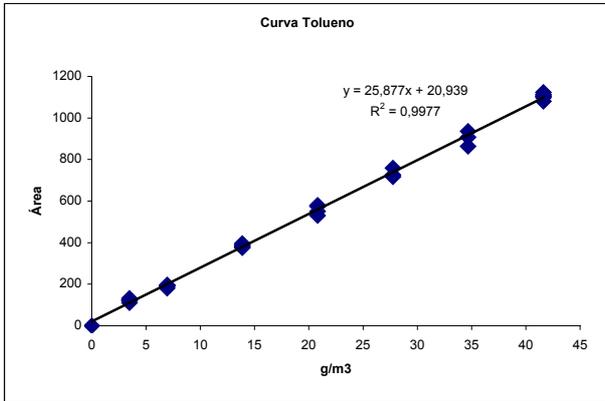
**Linder Markus, Selber Klaus, Nakari-Setälä Tina. 2001.** The hydrophobins HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei* Showing Efficient Interactions with Nonionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Systems. *Biomacromolecules.* 2: 511-517.

- López L.V.; Hans Börje J. 2001.** Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad. 6: 12-15
- Macura AB. 1987.** Hydrophobicity of *Candida albicans* related to their adherence to mucosal epithelial cells. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Ser. A. 266:491-496.
- Marín CMC. 2006.** Evaluación de la actividad quitinolítica y expresión de hidrofobinas de cepas de *Lecanicillium* en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles. Tesis Maestría.
- Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, Shirai K. 2004.** Production of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase of *Lecanicillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. Process Biochem. 39 (6): 665–71.
- McBride MB. 1994.** The Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press. p. 406 .
- Meza J, Lomascolo A, Casalot, Sigoillot J, Auria R. 2005.** Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer Process Biochemistry (40) 3365–3371.
- Napolitano R. and M. P. Juárez 1997.** Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans*. Arch. Biochem. Biophys. 344: 208-214.
- O’Leary ND, O’Connor KE y Dobson ADW. 2002.** Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. FEMS Microbiol Rev 26: 403–417.
- Ottengraf SPP, van Den Oever AHC. 1983.** Kinetics of organic compound removal from waste gases with biological filter. Biotechnology and Bioengineering Vol. 25, 12: 3089-3102.
- Pedrós-Marí B. 2003.** Clonación y caracterización de una hidrofobina de clase II (CaHPB) de *Candida albicans*. Tesis doctoral.
- Prenafeta Boldu Fx, Kuhn A, Luykx D, anke H, van Groenestijn JW de Bont JAM 2001.** Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. Mycol 105 :477-484.
- Prenafeta-Boldu F. X., Richard Summerbell y G. Sybren de Hoog. 2005** Fungi growing mononaromatic hydrocarbons: biotechnology’s unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol. p. 1–22
- Quintero RR. 1981.** Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones. Alhambra Mexicana.
- Shriner R, Fuson C, Curtin D. 1997.** Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Limusa Noriega Editores, México. p. 86-87.
- Randall JD y Hemmingsen BB. 1994.** A critical evaluation of the fume plate method for the enumeration of bacteria capable of growth on volatile hydrocarbons. Applied Biotechnology for Site Bioremediation. Vol. (Hinchee RE, Anderson DB y Sayles GD, eds), p. 400–404. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Raymond J. St. Leger,\* Lokesh Joshi, and Donald Roberts. 1998.** Ambient pH is a Major Determinant in the Expression of Cuticle- Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Applied and Environmental Microbiology 64: 709-713.

- Revah S, Morgan-Sagastume JM. 2005.** Methods for odor and VOC control en Biotechnology for Odour and Air Pollution. Shareefdeen Z., Singh A. Eds. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. p. 29-64.
- Ruiz HJ. 2001.** El asombroso reino de los hongos. Avance y Perspectiva. 20: 275-281.
- Sabatini. D, Knox R. y Harwell J. 1994.** Surface-Enhanced Subsurface Remediation. American. Chemical, Washington DC. p. 11-29.
- Schachter B. 1996.** A Century of Micology. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Scherrer S., Onno M. H. 2000.** Interfacial Self-Assembly of Fungal Hydrophobins of the Lichen-Forming Ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*. Fungal Genetics and Biology 30: 81-93.
- Scholtmeijer K. J.G. H. Wessels H. A. B. Wösten. 2001.** Fungal hydrophobins in medical and technical applications. 56: 1-8.
- Schuren, F. H., and J. G. Wessels. 1990.** Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating type genes. Gene 90:199-205.
- Schuurs, T. A., H. J. Dalstra, J. M. Scheer, and J. G. Wessels. 1998.** Positioning of nuclei in the secondary Mycelium of *Schizophyllum commune* in relation to differential gene expression. Fungal Genet. Biol. 23:150-161.
- Segers, G. C., W. Hamada, R. P. Oliver, and P. D. Spanu. 1999.** Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. Mol. Gen. Genet. 261:644-652.
- Simioni D, 2003.** Contaminación atmosférica y conciencia ciudadana. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).p. 129-160.
- Sobel, JD, Myers PG, Kaye D, and Levison ME. 1981.** Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. J. Infect. Dis. 143:76-82.
- Spigno G, Pagella C, Fumi MD, Molteni R, De Faveri DM. 2003.** VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. Chem Eng Sci 58: 739-746.
- St.Leger RJ, Joshi I y Robert D. 1998.** Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Applied and Environmental Microbiology, 64 (2): 709-713.
- Stringer, M.A. and Timberlake, W.E. 1995.** *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. Mol. Microbiol. 16, p. 33-44.
- Theo H.M. Smits, Lukas Y. Wick, Hauke Harmas and Christoph Keel. 2003.** Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. Environmental Microbiology 5: 85-91.
- Ulloa M. 1991.** Diccionario Ilustrado de Micología . UNAM.
- van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. 2003.** Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. Oil Gas Sci Technol 58: 427-440.
- van Lith C. 1986.** "Biofiltration, an essential technique in air pollution control". ClairTech. Netherlands 1-13
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., and Zehnder, A.J.B. 1987.** The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl Environ Microbiol 53: 1893–1897.

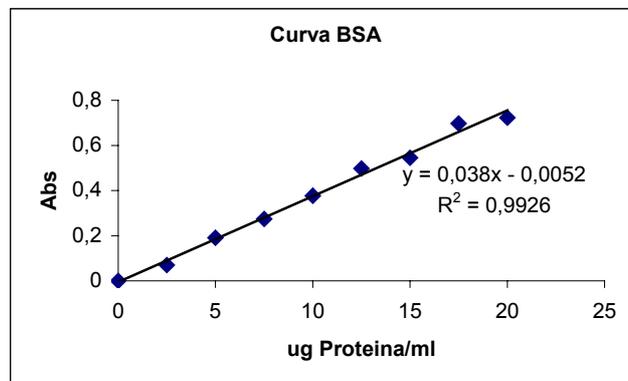
- van Wetter, M. A., H. A. Wösten, and J. G. Wessels. 2000.** SC3 and SC4 Hydrophobins have distinct functions in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Mol. Microbiol.* 36:201-210.
- Vergara-Fernández A, Van Haaren B, Revah S. 2006.** Phase partition of gaseous hexane and surface hydrophobicity of *Fusarium solani* when grown in liquid and solid media with hexanol and hexane. *Biotechnol Lett.* 28:2011–2017
- Vesilind PA, Perirce J, Weiner RF. 1990.** *Environmental Pollution and Control.* 3a. Edición. p.249.
- Wang Xiaoqin 2004.** Insight into the interfacial self-assembly and structural changes of hydrophobins Tesis
- Weber FJ, Hage KC y de Bont JAM. 1995.** Growth of the fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. *Appl Environ Microbiol* 61: 3562–3566.
- Wessels J. G. 1997.** Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol.* 38:1-45.
- Wösten HAB and Willey JM. 2000.** Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology* 146: 767-773.
- Wösten HAB. 2001.** *Annu. Rev. Microbiol.* 55:625–46
- Woertz JR, Kinney KA, McIntosh NDP, Szanislo PJ. 2001.** Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnol Bioeng* 75:550-558.
- Ying SH. y Feng MG. 2004.** Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology* 97, 323–331

## Anexo 1. Curvas estándar.

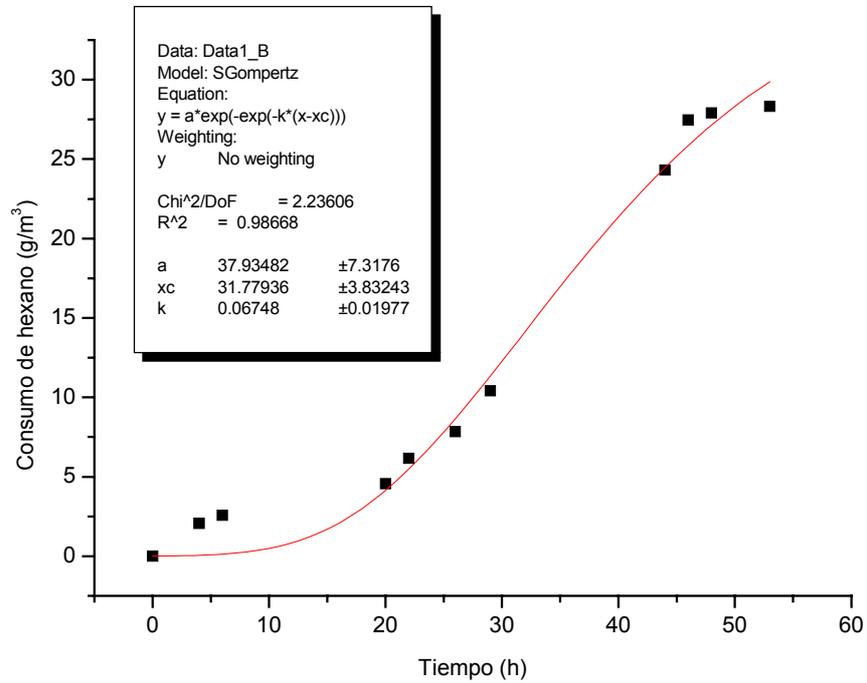


$$C_{CO_2} = (A_{CO_2} / A_{total}) F_c$$

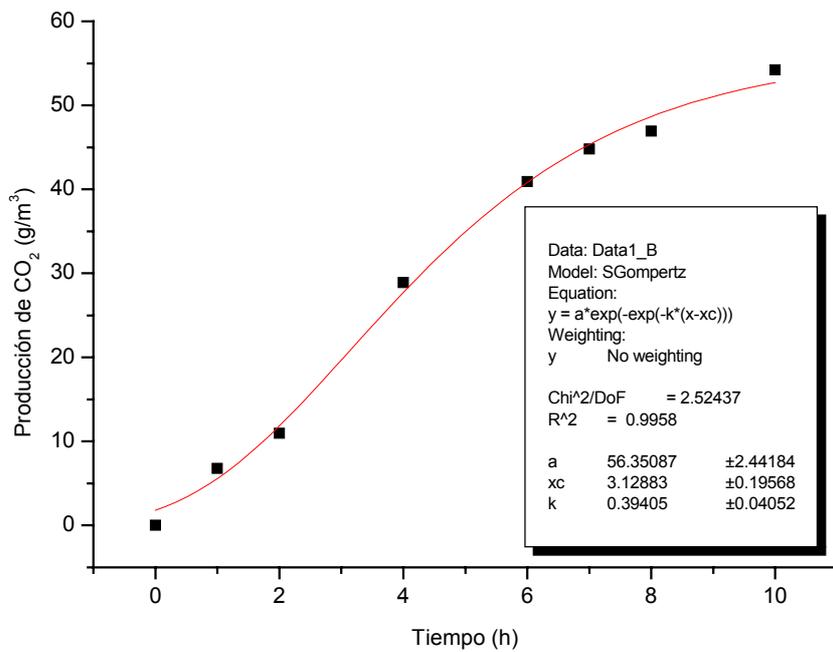
donde  $F_c = 1200.540 \text{ g/m}^3$



**Anexo 3a.**  
**Datos del consumo de hexano en función del tiempo ajustados con el modelo de Gompertz**



**Anexo 3b.**  
**Datos de la producción de CO<sub>2</sub> al consumir etanol en función del tiempo ajustados con el modelo de Gompertz**



## Anexo 2. Análisis estadístico del ángulo de contacto

Los datos del ángulo de contacto de los controles y los tres tratamientos son analizados como un diseño completamente aleatorizado (DCA), siendo los tratamientos hexano, etanol y glucosa, utilizando como controles vidrio, parafilm y teflón, para lo cual se plantea la siguiente hipótesis:

**Hipótesis:**

$H_0: \mu_{Vidrio} = \mu_{Parafilm} = \mu_{Teflon} = \mu_{Hexano} = \mu_{Etanol} = \mu_{Glucosa}$  (en promedio las seis superficies producen la misma respuesta)

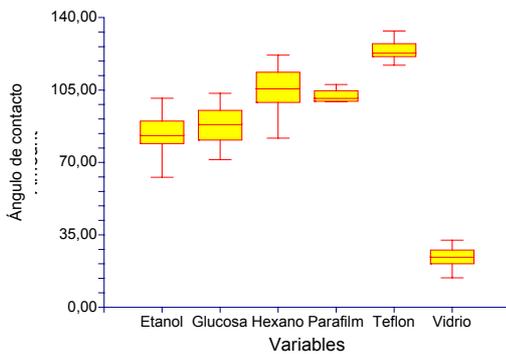
$H_a$ : no todas las  $\mu$  son iguales (al menos una condición produce una respuesta promedio diferente del promedio de cuando menos una de las demás condiciones)

**1.2.1.1.1 Nota:** Después del analizar los datos como un DBCA, se considera que el tipo de membrana no tiene efecto sobre la variable respuesta. Por lo tanto se utilizan en conjunto todos los datos para analizar solamente el efecto que produce el tratamiento y encontrar las diferencias.

**Tests of Assumptions Section**

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-1,5696	0,116497	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	1,0649	0,286938	Accept
Omnibus Normality of Residuals	3,5977	0,165487	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	8,1217	0,000001	Reject

## 2 Box Plot Section



**Analysis of Variance Table**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A ( ... )	5	141084,7	28216,94	497,61	0,000000*	1,000000
S(A)	195	11057,47	56,70497			
Total (Adjusted)	200	152142,2				
Total	201					

\* Term significant at alpha = 0,05

**Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks**

**Hypotheses**

$H_0$ : All medians are equal.

$H_a$ : At least two medians are different.

**Test Results**

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	5	161,9341	0,000000	Reject Ho
Corrected for Ties	5	161,9404	0,000000	Reject Ho

Number Sets of Ties 21  
 Multiplicity Factor 312

**Group Detail**

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
Etanol	41	2626,50	64,06	-4,5576	83,35
Glucosa	46	3524,50	76,62	-3,2372	88,68
Hexano	46	6582,50	143,10	5,5897	105,92
Parafilm	23	3115,00	135,43	3,0169	101,31
Teflon	22	4176,50	189,84	7,5912	123,15
Vidrio	23	276,00	12,00	-7,7976	24,56

**Duncan's Multiple-Comparison Test**

Response: Etanol,Glucosa,Hexano,Parafilm,Teflon,Vidrio  
 Term A:

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=195 MSE=56,70497

Group	Count	Mean	Different From Groups
Vidrio	23	24,30609	Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano, Teflon
Etanol	41	84,00536	Vidrio, Glucosa, Parafilm, Hexano, Teflon
Glucosa	46	87,95435	Vidrio, Etanol, Parafilm, Hexano, Teflon
Parafilm	23	102,187	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Hexano	46	105,5298	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Teflon	22	124,18	Vidrio, Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means. According to Hsu(1996, page 130), the specified family-wise error rate (alpha) is overstated and the Tukey-Kramer method is recommended instead.

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: Etanol,Glucosa,Hexano,Parafilm,Teflon,Vidrio  
 Term A:

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=195 MSE=56,70497 Critical Value=4,0705

Group	Count	Mean	Different From Groups
Vidrio	23	24,30609	Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano, Teflon
Etanol	41	84,00536	Vidrio, Parafilm, Hexano, Teflon
Glucosa	46	87,95435	Vidrio, Parafilm, Hexano, Teflon
Parafilm	23	102,187	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Hexano	46	105,5298	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Teflon	22	124,18	Vidrio, Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano

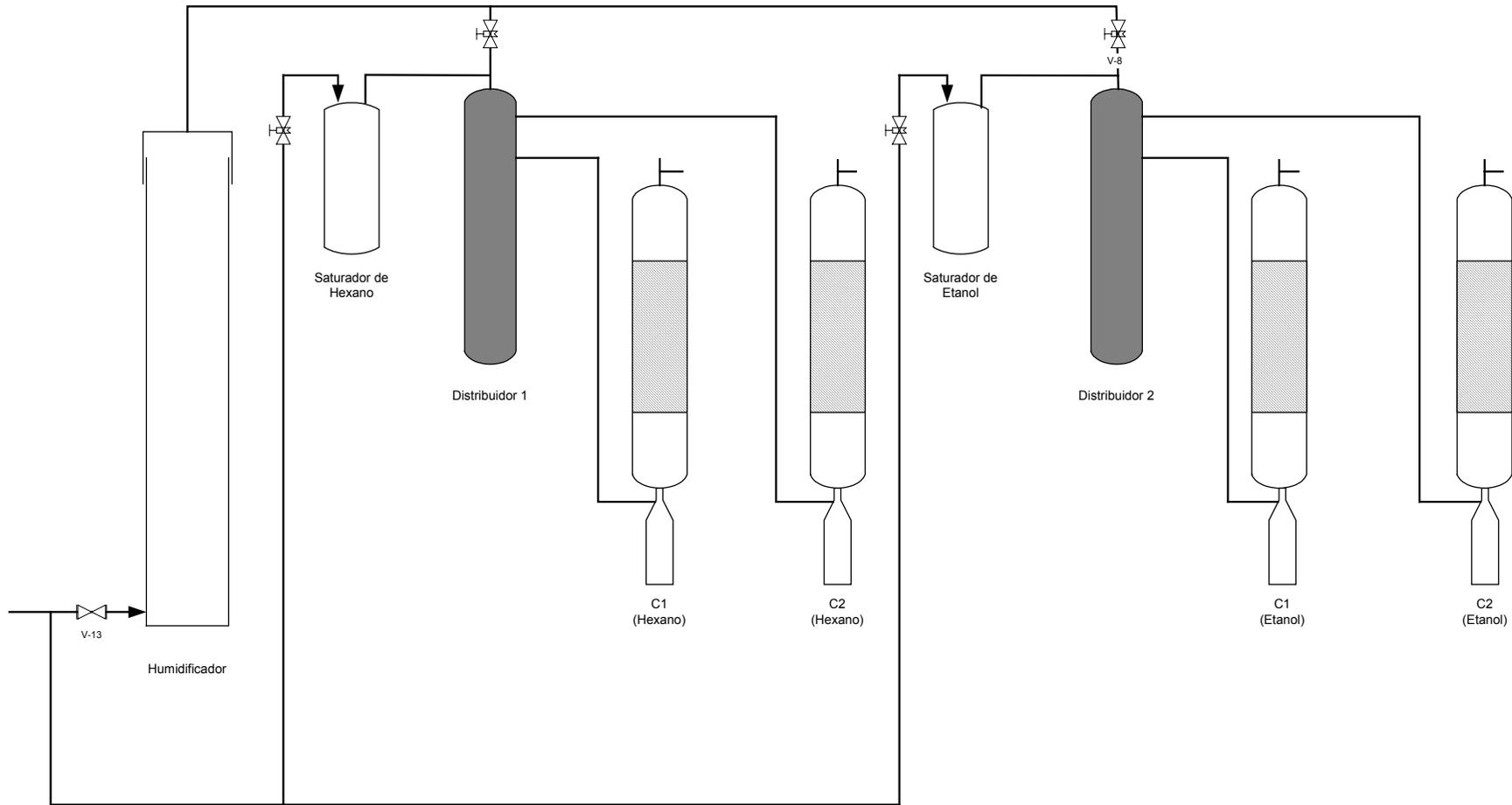
Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

**Conclusiones estadísticas del análisis de resultados analizado como un DCA.**

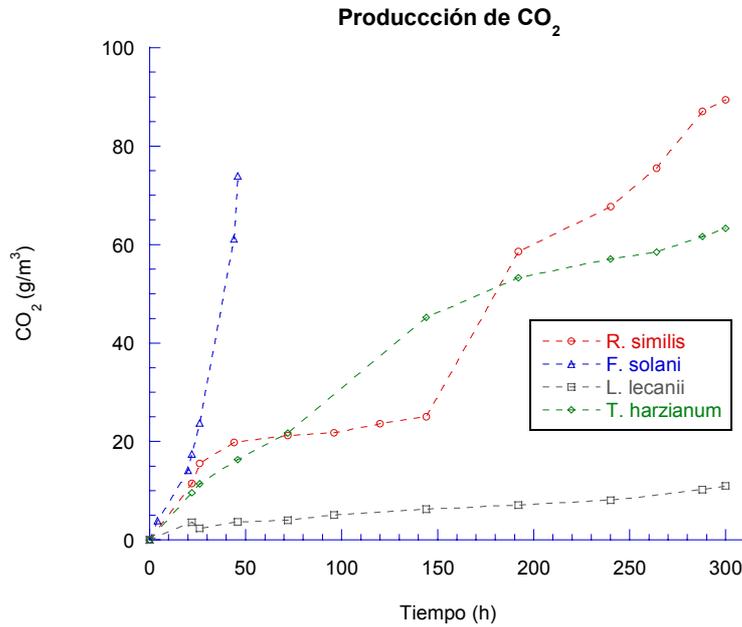
- a) De la tabla de ANOVA se obtiene un ProbLevel de  $0,000000 < \alpha (0.05)$ , por lo que se rechaza  $H_0$ , y se concluye que la hipótesis alternativa es verdadera. Es decir, que al menos una condición produce una respuesta diferente promedio de cuando menos una de las demás condiciones.
- b) Con la prueba de Kruskal-Wallis también se rechaza  $H_0$ , lo que implica que al menos dos medias son diferentes.
- c) Con la prueba de Duncan se encuentra que no existe diferencia significativa entre la respuesta promedio del Hexano y Parafilm.
- d) Sin embargo dado que las muestras no son del mismo tamaño se realiza la prueba de Tukey-Kramer, donde se obtiene que no existe diferencia significativa entre la respuesta promedio del Etanol y Glucosa. Así como que no existe diferencia significativa entre la respuesta promedio del Hexano y Parafilm.

**Anexo 4.**  
**Diagrama de configuración de columnas de biofiltración escala laboratorio.**



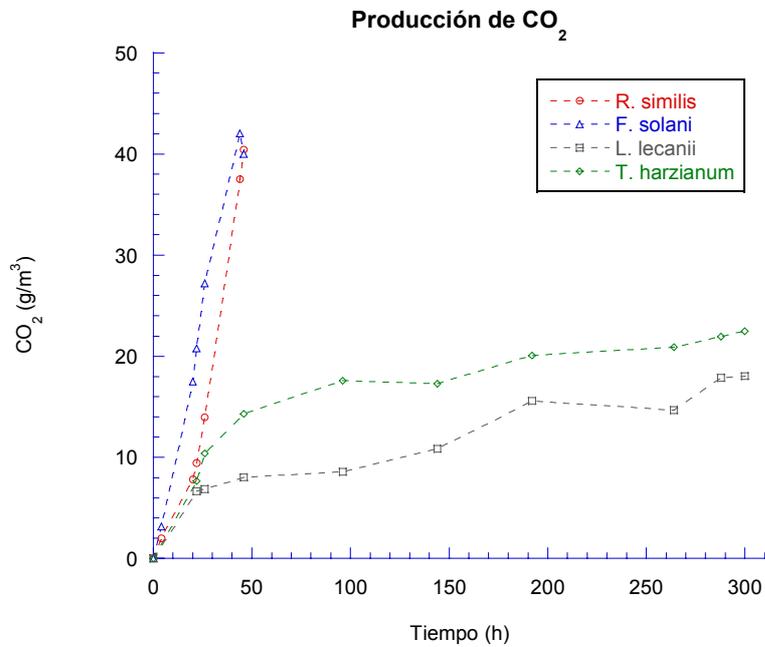
### 3 Anexo 5a.

Perfiles de producción de CO<sub>2</sub> con respecto al tiempo de los hongos *R. similis*, *F. solani*, *L. lecanii* y *T. harzianum* al consumir tolueno

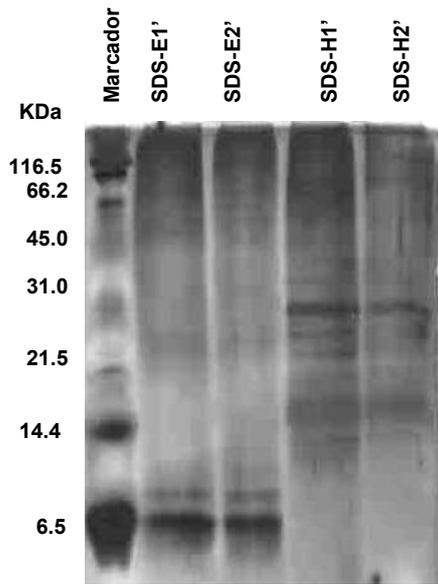


### Anexo 5b.

Perfiles de producción de CO<sub>2</sub> con respecto al tiempo de los hongos *R. similis*, *F. solani*, *L. lecanii* y *T. harzianum* al consumir hexano

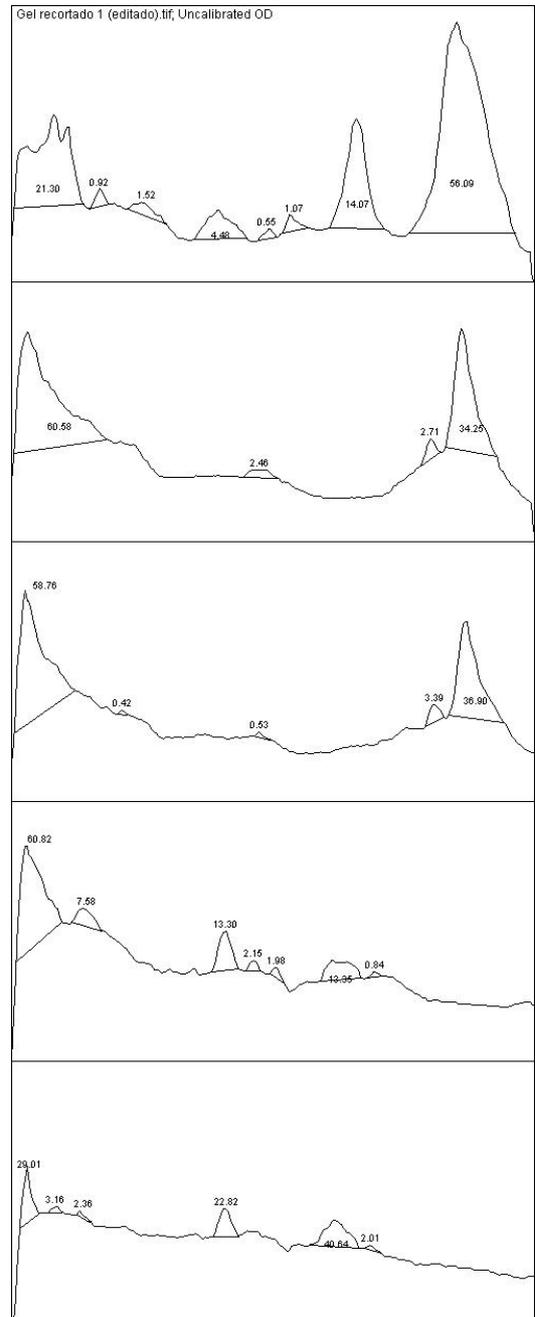


## Anexo 6. Densitometrias de geles



**Figura A.** SDS-PAGE con tinción de plata de proteínas extraídas con SDS 2% de micelio crecido en columnas de biofiltración. **M:** Marcador de peso molecular. **SDS-E:** Proteínas extraídas con SDS de micelio crecido con etanol. **SDS-H:** Proteínas extraídas con SDS de micelio crecido en hexano.

SDS-E1'	SDS-E2'	SDS-H1'	SDS-H2'
		<b>34,5</b>	<b>35,6</b>
		<b>28,8</b>	<b>29,1</b>
		13.30%	22.82%
24,5	23,7	24,5	25,0
21,7	21,7	21,6	22,3
		2.15%	
		<b>18,0</b>	<b>18,6</b>
		1.98%	
		<b>14,8</b>	<b>15,3</b>
		13.95%	40.64%
13,6	-		
2.46 %			
		<b>12,0</b>	<b>12,4</b>
		0.84%	2.01%
<b>8,6</b>	<b>8,5</b>		
2.71%	3.39%		
<b>7,0</b>	<b>7,0</b>		
34.25%	36.90%		



**Figura B.** Densitometría del gel mostrado en la figura A.

**“Estudio de la respuesta fisiológica de hongos  
filamentosos al crecer con sustratos gaseosos  
de diferente grado de hidrofobicidad”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A :

**I.B.I Juan Gabriel Viguera Ramírez**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev<sup>1</sup>

Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto<sup>2</sup>

Dra. Marcia Morales Ibarría<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C, c/o IPH, UAM-I

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, UAM-I

<sup>3</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C