

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Biodegradación de ftalatos por *Pleurotus ostreatus* y *Fusarium culmorum*  
crecidos en medio líquido**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental**

**P R E S E N T A**

**M. en C. Miriam Ahuactzin Pérez**

**Comité Tutorial**

**Comité de tutores:**

**Dra. María del Carmen Sánchez Hernández-Universidad Autónoma de Tlaxcala**

**Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz-Universidad Autónoma Metropolitana**

**Asesor:**

**Dr. Saúl Tlecuítl Beristain-Universidad Politécnica de Tlaxcala**

**Febrero, 2017**

**El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el mismo apoyo del consejo, clave DAFCYT-2003IDTNNN0020. Beca No. 351476.**

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

**"Biodegradación de fitatos por *Flaurotus ostreatus* y *Fusarium culmorum* crecidos en medio líquido"**

que presentó

**Miriam Ahuactzin Pérez**

El día 1 de febrero del año 2017

### Sinodales

**Presidente: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana**

**Secretario: Dr. Saúl Tecuflí Beristain, Universidad Politécnica de Tlaxcala**

**Vocal 1: Dra. Roxana Uri Miranda Labra, Universidad Autónoma Metropolitana**

**Vocal 2: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, Universidad Autónoma Metropolitana**

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico de manera especial a mi esposo Carlos y a mi hijo Carlitos por acompañarme y apoyarme de manera incondicional en este trayecto. Esto es por ustedes y para que te motive Carlitos a seguir por este rumbo. Gracias por su amor infinito hacia mí y por enseñarme día a día cómo amarlos. Los amo con todo mi ser.

A mis padres, Jaime y Miriam, por enseñarme cómo lograr lo que me propongo y por el amor y apoyo absoluto que siempre me brindan. Los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Iván, por su cariño, apoyo y porque has sido mi compañero incondicional la mayor parte de mi vida. Te quiero mucho hermano.

A mi mejor amigo y confidente José Luis Torres García, por estar allí para mí siempre que lo necesito. Por el apoyo incondicional, amor y ayuda. Ocúpate de lo importante y deja que las cosas vayan fluyendo.

## RESUMEN

Los ftalatos son diésteres aromáticos ampliamente utilizados como plastificantes, estos compuestos además de ser contaminantes desempeñan un papel como disruptores endócrinos. El ftalato más empleado es el di (2-etilhexil) ftalato (DEHF), seguido por dibutil ftalato (DBF), estos compuestos han sido detectados en suelo, agua, alimentos, pescado y efluentes industriales. En esta investigación se evaluaron diferentes parámetros para los hongos *Fusarium culmorum* y *Pleurotus ostreatus* crecidos en concentraciones de 1000 y 500 mg/l de DEHF y DBF, como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la biomasa máxima producida ( $X_{m\acute{a}x}$ ), el consumo de glucosa, la constante de biodegradación ( $k$ ) para DBF y DEHF la eficiencia de remoción (%), actividades enzimáticas de lacasas y estererasas al igual que los rendimientos de las enzimas con respecto al sustrato ( $Y_{E/X}$ ), la productividad enzimática ( $P= E_{m\acute{a}x}/h$ ), la actividad enzimática máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ) y la tasa específica de formación de la enzima  $q_p= (\mu) (Y_{E/X})$ .

Se identificaron diferentes intermediarios en la biodegradación de DEHF y DBF por GC-MS y a partir de eso se propusieron rutas de degradación para estos compuestos empleando un modelo de química cuántica. *Fusarium culmorum* mostró la mayor  $\mu$  ( $0.05 \text{ h}^{-1}$ ) en el medio con 1000 mg/l de DEHF. Tanto *P. ostreatus* como *F. culmorum* consumieron alrededor de un 95 % de la glucosa en los medios que contenían DEHF 1000 mg/l durante las 360 y 144 h de crecimiento, respectivamente. La mayor  $X_{m\acute{a}x}$  y el mayor  $Y_{X/S}$  se presentaron tanto para *P. ostreatus* como para *F. culmorum* en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF. *Pleurotus ostreatus* mostró la mayor  $X_{m\acute{a}x}$  y el

mayor  $Y_{X/S}$  obteniendo un valor de 7.69 g/l y 0.76 gX/gS, respectivamente. El pH de los cultivos de *P. ostreatus* que contenían ftalatos disminuyeron mostrando valores cercanos a un pH de 4. El pH de los cultivos de *F. culmorum* incrementaron sus valores obteniendo un pH cercano del valor neutro. *Pleurotus ostreatus* mostró la mayor producción y  $E_{m\acute{a}x}$  de enzimas lacasas en el medio que contenía 1000 mg/l de DEHF, mostrando valores de 11508 U/l. La mayor actividad y  $E_{m\acute{a}x}$  de enzimas estererasas fue de 4765 U/l, producida por el hongo *F. culmorum* en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF. Los mayores parámetros cinéticos enzimáticos los presentó *P. ostreatus* para las enzimas lacasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF. *Fusarium culmorum* mostró los mayores parámetros cinéticos de enzimas estererasas en los medios que contenían 1000 mg/l de DEHF y DBF. *Pleurotus ostreatus* y *F. culmorum* obtuvieron más del 90 % de remoción de ambos ftalatos a partir de las 300 y 72 h de crecimiento, respectivamente. Con base en los estudios de química cuántica se pudo observar que *P. ostreatus* siguió una ruta de degradación metabolizando el DEHF a ácido ftálico, ácido acético y hexanal. El DBF fue metabolizado a ácido ftálico y ácido acético. Éste, posteriormente, lo mineralizó completamente a  $CO_2$ . *Fusarium culmorum* fue capaz de metabolizar el DEHF obteniendo como producto final butanediol y el DBF lo metabolizó a ácido fumárico y ácido málico, metabolitos detectados por GC-MS y analizados por el intercambio de electrones que nos permitió observar el estudio de química cuántica. *P. ostreatus* y *F. culmorum* ofrecen un gran potencial en la biorremediación de lugares contaminado con DEHF y DBF, ya que utilizan estos contaminantes como fuente de carbono y energía.

## ABSTRACT

Phthalates are aromatic diesters widely used as plasticizers. These compounds are also pollutants and endocrine disruptors. The most commonly used phthalate is di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), followed by dibutyl phthalate (DBP). These compounds have been detected in soil, water, food, fish and industrial effluents. Growth kinetics ( $\mu$  and  $X_{\text{máx}}$ ), glucose consumption, constant biodegradation ( $k$ ) for dibutyl phthalate (DBP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), percentage of removal efficiency, laccases and esterase activities and enzymatic performance were evaluated for *Fusarium culmorum* and *Pleurotus ostreatus* grown on media containing glucose and different concentrations of DEHP and DBP (0, 500 and 1000 mg/l). Different intermediates in the biodegradation of DEHP and DBF by GC-MS were identified and degradation pathways for these compounds were proposed using quantum chemical modeling. The greatest  $\mu$  (0.05 h<sup>-1</sup>) occurred in media supplemented with 1000 mg/l of DEHP/l. *P. ostreatus* and *F. culmorum* consumed 95% of glucose in media containing 1000 mg/l de DEHP/l within 360 and 144 h of growth, respectively. The greatest  $X_{\text{máx}}$  and the largest  $Y_{X/S}$  occurred in media supplemented with 1000 mg/l of DEHP/l for these fungi. The pH of cultures of *P. ostreatus* containing phthalates decreased, presenting values close to pH 4 while pH of *F. culmorum* increased pH close neutral value. The greatest production and laccase activity were observed in media containing 1000 mg/l of DEHP/l for *P. ostreatus*. The greatest production and esterase activity were observed in media containing 1000 mg/l de DEHP/l for *F. culmorum*. The higher enzymatic yield parameters occurred in media supplemented with 1000 mg/l de DEHP/l for these fungi.

These fungi could degrade more than 90% of both phthalates and metabolized to intermediates of different metabolic pathways (Krebs Cycle and butanediol fermentation). The compounds of biodegradation of DEHP were identified by GC-MS. A DEHP and DBP biodegradation pathway by *F. culmorum* and *P. ostreatus* were proposed using quantum chemical modeling. *P. ostreatus* and *F. culmorum* offer great potential in bioremediation of sites contaminated with DEHP and DBF as they use these pollutants as carbon and energy source.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ftalatos.....	1
1.2. Di (2-etilhexil) ftalato .....	4
1.3. Dibutil ftalato .....	5
1.4. Toxicidad de ftalatos .....	6
1.5. Hongos Basidiomicetos .....	8
1.5.1. Ciclo de vida de hongos basidiomicetos .....	9
1.5.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	11
1.6. Hongos Ascomicetos .....	12
1.6.1. Ciclo de vida de hongos ascomicetos .....	13
1.6.2. <i>Fusarium culmorum</i> .....	15
1.7. Enzimas lacasas .....	16
1.8. Enzimas esterasas.....	17
1.9. Biodegradación de ftalatos por hongos .....	18
1.10. Cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC-MS).....	20
1.11. Fermentación líquida .....	23
2. ANTECEDENTES.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31

5. OBJETIVOS.....	31
5.2. Objetivos específicos .....	31
6.1. Organismos de estudio.....	32
6.3. Preparación de medios de cultivo .....	33
6.4. Producción de biomasa, parámetros cinéticos de crecimiento y perfiles de pH.....	33
6.5. Actividad enzimática .....	34
6.5.1. Obtención del sobrenadante .....	34
6.5.2. Actividad enzimática de lacasas .....	35
6.5.3. Actividad enzimática de esterases .....	35
6.5.4. Parámetros cinéticos enzimáticos .....	36
6.6. Determinación del consumo de glucosa.....	36
6.7. Análisis de cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas .....	36
6.8. Biodegradación y la eficiencia de remoción de los ésteres de ftalato .....	38
6.10. Análisis estadístico .....	39
7. RESULTADOS .....	39
7.1. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y <i>F. culmorum</i> en fermentación líquida y consumo de la glucosa en los sobrenadantes .....	39

7.1.1. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y consumo de glucosa en los medios adicionados con DEHF .....	39
7.1.2. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y consumo de glucosa en los medios que contienen DBF .....	41
7.1.3. Crecimiento de <i>F. culmorum</i> y consumo de glucosa en los medios que contienen DEHF .....	42
7.1.4. Crecimiento de <i>F. culmorum</i> y consumo de glucosa en los medios adicionados con DBF .....	44
7.2. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y <i>F. culmorum</i> .....	45
7.2.1. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DEHF. ....	45
7.2.2. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	46
7.2.1. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	47
7.2.2. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	48
7.3. pH de <i>P. ostreatus</i> y <i>F. culmorum</i> .....	49
7.3.1. pH de los sobrenadantes de los cultivos de <i>P. ostreatus</i> crecido en DEHF .....	49
7.3.2. pH de los sobrenadantes de los cultivos de <i>P. ostreatus</i> crecido en DBF	50

7.3.3. pH de los sobrenadantes de los cultivos de <i>F. culmorum</i> conteniendo DEHF .....	51
7.3.4. pH de los sobrenadantes de los cultivos de <i>F. culmorum</i> conteniendo DBF .....	52
7.4. Actividad enzimática de lacasas.....	54
7.4.1. Actividad enzimática específica de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DEHF .....	54
7.4.2. Actividad enzimática específica de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	55
7.4.3. Actividad enzimática de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF .....	56
7.4.4. Actividad enzimática de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	58
7.5. Parámetros cinéticos de producción de lacasas.....	59
7.5.1. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DEHF .....	59
7.5.2. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	60
7.5.3. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF .....	61

7.5.4. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	62
7.6. Actividad enzimática específica de esterasas.....	63
7.6.1. Actividad enzimática específica de esterasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DEHF .....	63
7.6.2. Actividad enzimática de esterasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	64
7.6.3. Actividad enzimática de esterasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	65
7.6.4. Actividad enzimática de esterasa de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	66
7.7. Parámetros cinéticos de producción de esterasas.....	67
7.7.1. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	67
7.7.2. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	68
7.7.3. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	69
7.7.4. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF .....	70
7.8. Biodegradación y eficiencia de remoción de DEHF .....	71

7.8.1. Biodegradación y eficiencia de remoción de DEHF por <i>P. ostreatus</i> .....	71
7.8.2. Biodegradación y eficiencia de remoción de DEHF por <i>F. culmorum</i> .....	73
7.9. Biodegradación y eficiencia de remoción de DBF .....	74
7.9.2. Biodegradación y eficiencia de remoción de DBF por <i>F. culmorum</i> .....	76
7.10. Ruta de degradación del DEHF .....	77
7.10.1. Ruta de degradación de DEHF por <i>P. ostreatus</i> .....	77
7.10.2. Ruta de degradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> .....	78
7.11. Ruta de degradación del DBF .....	81
7.11.1 Ruta de degradación de DBF por <i>P. ostreatus</i> .....	81
7.11.2. Ruta de degradación de DBF por <i>F. culmorum</i> .....	83
8. DISCUSIÓN .....	85
9. RESUMEN DE RESULTADOS .....	92
10. CONCLUSIÓN .....	93
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Principales esteres de ftalato utilizados a nivel mundial.....	3
Fig. 2. Ciclo de vida de hongos Basidiomicetos.....	11
Fig. 3. Ciclo de vida de hongos Ascomicetos.....	15
Fig. 4. Colonia de <i>F. culmorum</i> crecida en PDA.....	16
Fig. 5. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS).....	22
Fig. 6. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida y consumo de glucosa en el medio de GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF.....	40
Fig. 7. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida y consumo de glucosa en el medio GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF.....	42
Fig. 8. Crecimiento de <i>F. culmorum</i> en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida y consumo de glucosa en los medios GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF.....	43

Fig. 9. Crecimiento de <i>F. culmorum</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida y consumo de glucosa en los medios GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF.....	45
Fig. 10. pH de la cepa <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.....	50
Fig. 11. pH de la cepa <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	51
Fig. 12. pH de la cepa <i>F. culmorum</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.....	52
Fig. 13. pH de la cepa <i>F. culmorum</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	53
Fig. 14. Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.....	55
Fig. 15. Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	56
Fig. 16. Actividad enzimática de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida .....	57
Fig. 17. Actividad enzimática de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	58



Fig. 18. Actividad enzimática de esterasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	63
Fig. 19. Actividad enzimática de esterasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	64
Fig. 20. Actividad enzimática de esterasas de <i>F. culmorum</i> crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.....	65
Fig. 21. Actividad enzimática de esterasas de <i>F. culmorum</i> crecido GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.....	66
Fig. 22. Porcentaje de biodegradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> (a) y concentración de DEHF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar <i>k</i> (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DEHF.....	72
Fig. 23. Porcentaje de biodegradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> (a) y concentración de DEHF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar <i>k</i> (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DEHF.....	74
Fig. 24. Porcentaje de biodegradación de DBF por <i>P.ostreatus</i> (a) y concentración de DBF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar <i>k</i> (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DBF.....	75

Fig. 25. Porcentaje de biodegradación de DBF por <i>F. culmorum</i> (a) y concentración de DBF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar $k$ (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DBF.....	77
Fig. 26. Ruta de biodegradación propuesta de DEHF por <i>P. ostreatus</i> . Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.....	78
Fig. 27. Ruta de biodegradación propuesta de DEHF por <i>F. culmorum</i> . Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.....	80
Fig. 28. Ruta de biodegradación propuesta de DBF por <i>P. ostreatus</i> . Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.....	82
Fig. 29. Ruta de biodegradación propuesta de DBF por <i>F. culmorum</i> . Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS .....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido en fermentación líquida conteniendo DEHF.....	48
Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido en fermentación líquida conteniendo DBF.....	49
Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>F. culmorum</i> crecido en fermentación líquida conteniendo DEHF.....	51
Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>F. culmorum</i> crecido en fermentación líquida conteniendo DBF.....	52
Tabla 5. Parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas por <i>P. ostreatus</i> crecido en fermentación líquida conteniendo DEHF.....	61
Tabla 6. Parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas por <i>P. ostreatus</i> crecido en fermentación líquida conteniendo DBF.....	62
Tabla 7. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	63
Tabla 8. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF.....	64
Tabla 9. Parámetros cinéticos de producción de esterases de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	69
Tabla 10. Parámetros cinéticos de producción de esterases de <i>P. ostreatus</i> crecido en los medios que contienen DBF.....	70

Tabla 11. Parámetros cinéticos de producción de esterases de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DEHF.....	71
Tabla 12. Parámetros cinéticos de producción de esterases de <i>F. culmorum</i> crecido en los medios que contienen DBF.....	72

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ftalatos

Los ftalatos son dialquil o alquil aril ésteres del ácido ftálico (1,2-bencendicarboxílico) conformados estructuralmente por un anillo bencénico unido a dos cadenas laterales que pueden ser lineales, alifáticos ramificados, cicloalifáticos o aromáticos. Los ésteres de ftalato son compuestos industriales usados principalmente como plastificantes y aditivos para incrementar la flexibilidad y maleabilidad a los productos plásticos. Los ftalatos representan una preocupación importante debido al uso indiscriminado de los plásticos, su ubicuidad en el medio ambiente y la alteración de la actividad del sistema endocrino (Zhu 2010).

Estos compuestos químicos se utilizan en la manufactura de plásticos, textiles, papel, repelentes contra insectos, plaguicidas, cosméticos y poliuretanos (Chang et al. 2004; Kim et al. 2002; Mendoza 2008; Bustamante et al. 2001; Matsumoto et al. 2008). Los ftalatos no se unen químicamente al polímero y pueden migrar eventualmente al ambiente (Liang et al. 2008). Se ha estimado que la tasa promedio de consumo indirecto de estos compuestos por el humano es de 8 mg/persona/día. La producción de plastificantes en Estados Unidos de Norteamérica rebasa los 500 millones de kilogramos por año (Chang et al. 2007; Kim et al. 2002; Mendoza 2008; Bustamante et al. 2001).

Estos contaminantes se han detectado en aire, suelo, sedimentos y agua como resultado de la producción, uso y disposición de los plásticos (Liang et al. 2008). El ftalato más común es el di (2-etilhexil) ftalato (DEHF), seguido por dibutil ftalato (DBF), estos compuestos han sido detectados en suelo, agua, alimentos, pescado y efluentes industriales (Fig. 1) (CERHR 2006). El DEHF es menos susceptible a la degradación debido a la presencia de su cadena larga de éster comparándolo con los demás ftalatos. El DBF tiene gran importancia por su producción y aplicación. Asimismo, se producen cerca de veintiséis mil toneladas al año desde hace más de 40 años en la Unión Europea (CERHR 2006). Debido a la relativa polaridad y al bajo peso molecular de algunos ftalatos (DBF), se metabolizan principalmente a sus monoésteres en el organismo y posteriormente son excretados en la orina. Los ftalatos de alto peso molecular como el DEHF, di-n-octil ftalato (DnOF) y di-isononil ftalato (DINF) son hidrolizados a sus respectivos monoésteres, y después por una serie de reacciones químicas son biotransformados a sus metabolitos hidrofílicos.

En los ftalatos de bajo peso molecular primero se hidrolizan a su monoéster por la hidrólisis de uno de los enlaces éster presentes en este tipo de compuestos (Hauser y Calafat 2005). Se ha reportado que las altas concentraciones de DEHF y DBF en el ambiente se encuentran mayoritariamente en las aguas residuales y superficiales cercanas a las zonas de producción y procesado, así como en aire, suelo, sedimentos, lixiviados de rellenos sanitarios y diferentes depósitos naturales de agua (CERHR 2006; Zheng et al. 2007). Estos plastificantes se acumulan en invertebrados, peces y plantas. La mayor fuente de exposición a ftalatos se da por ingesta de alimentos,

probablemente por la alta migración de los ftalatos contenidos en los contenedores de plástico. Existen reportes de hepatotoxicidad, atrofia testicular, teratogénesis y carcinogénesis relacionados con ftalatos (Huber et al. 1996; Hashizume et al. 2002). El DEHF es rápidamente hidrolizado por la esterasas presentes en los intestinos, hígado, pulmones y otros tejidos al metabolito mono (2-etilhexil) ftalato (MEHF) y posteriormente a ácido ftálico anhidro. El MEHF es el principal metabolito producido en la degradación de DEHF y se cree es el componente activo responsable de los efectos tóxicos del DEHF (Fig. 1) (Reinsberg et al. 2009).

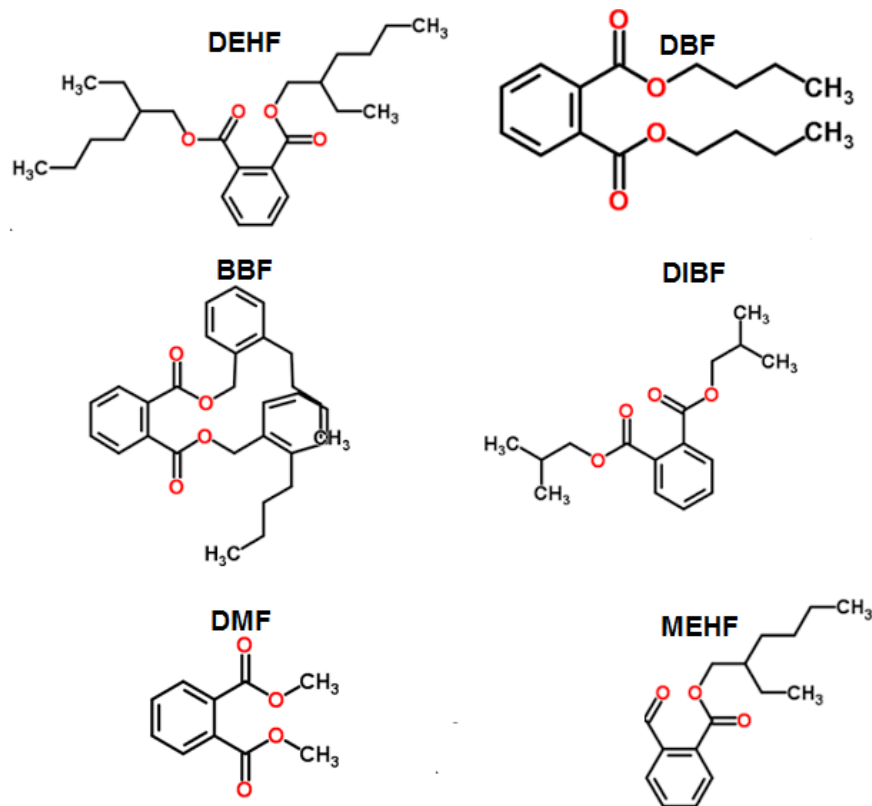


Fig. 1. Principales esteres de ftalato utilizados a nivel mundial (Hauser y Calafat 2005).

## 1.2. Di (2-etilhexil) ftalato

El DEHF es un compuesto orgánico cuya fórmula es  $C_6H_4 (C_8H_{17}COO)_2$ . Este compuesto es el más común de los ftalatos, ya que representó una presencia en el mercado del 54% en el 2010 y una producción anual de 3, 000,000 kg/año. Es un líquido viscoso, incoloro soluble en aceite, pero no en agua. Su punto de fusión es de  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  y su punto de ebullición es de  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La presión de vapor es de  $0.000034\text{ Pa}$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y su solubilidad en agua es de  $3\text{ g/l}$ . Su coeficiente de partición n-octanol/agua (valor logarítmico) es de  $7.5$  (TCS 2008). El DEHF es ampliamente utilizado como plastificante de productos vinílicos. Los plásticos contienen del 1 al 40 % de DEHF por peso y son usados en productos de consumo como imitación de piel, ropa impermeable, calzado, tapicería, suelos, alambre y cable, así como en manteles, cortinas de baño, materiales de envasado de alimentos y juguetes de niños. El cloruro de polivinilo contiene DEHF el cual es usado para la realización de tubos y envases utilizados para mantener muestras de sangre o realizar transfusiones. Además, es usado como fluido hidráulico y fluido dieléctrico en los condensadores electrónicos. El DEHF se encuentra también en el alcohol, detergentes líquidos, tintas decorativas, aceites lubricantes e industriales y agentes antiespumantes usados durante la manufactura de papel y cartón (TCS 2008).



### 1.3. Dibutil ftalato

El DBF se produce por la reacción del *n*-butanol con el ácido ftálico anhidro (Singh y Shoei-Lung 2011). Su fórmula molecular es  $C_{16}H_{22}O_4$  y su peso molecular es de 278.34 g/mol. Es un líquido aceitoso, cuyo punto de fusión es  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y el punto de ebullición  $340\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La presión de vapor de este compuesto es de 0.047 Pa a  $25^{\circ}\text{C}$ . Su solubilidad en agua es de 11.2 g/l y su coeficiente de partición *n*-octanol/agua (valor logarítmico) es de 4.72 (ECHA 2010). El DBF es un plastificante usado a menudo en combinación con otros ftalatos de alto peso molecular. Es usado extensamente en la industria de adhesivos para las emulsiones de polivinilo de acetato (PVA). La baja viscosidad y compatibilidad de DBF lo convierte en el compuesto adecuado para usarlo como adhesivo en la unión de materiales celulósicos. El DBF es un solvente excelente para la mayoría de los colorantes solubles en aceite, insecticidas, peróxidos y otros compuestos orgánicos. Como agente antiespumante y fibra lubricante en la manufactura de textiles. También es usado en la industria del revestimiento como plastificante primario de lacas de nitrocelulosa. Este ftalato les confiere flexibilidad a bajas temperaturas y es especialmente deseable porque tiene una amplia compatibilidad con la modificación de las resinas. En algunos países, es usado como ingrediente del esmalte de uñas porque lo hace resistente ante la pérdida de su revestimiento (ECHA 2010; Kamrin 2009).

#### 1.4. Toxicidad de ftalatos

Los ftalatos presentan efectos tóxicos para algunos animales como ratas y ratones. Se ha reportado que la actividad de disruptor endócrino de los compuestos DEHF, DBF, DEF, DMF, Butil Bencil ftalato (BBF) está relacionada directamente con la síntesis de hormonas sexuales. En experimentos *in vivo* e *in vitro*, se observó que las células de Sertoli representan el sitio principal de la toxicidad testicular inducida por ftalatos. Se conoce además que estos ftalatos están relacionados con toxicidad en animales a nivel reproductivo y de desarrollo. En estudios a corto y largo plazo utilizando roedores, los efectos adversos relacionados con la dosis se encontraron en hígado, riñón, glándula tiroidea, tejidos y testículos. Los efectos tóxicos observados en roedores preñados y fetos incluyen disminución en el número de implantaciones, aumento en la resorción fetal, disminución del peso corporal y aumento en las malformaciones. Las mutaciones inducidas por DEHF en los gametos de varones pueden ser transmitidos a la siguiente generación por medio de los espermatozoides. Los ftalatos actúan sobre la disminución de los niveles de andrógenos.

Se ha reportado un incremento en el daño reproductivo de varones infantiles después de la exposición prenatal a ftalatos sugiriendo que esto podría conducir a daños en la salud tanto de humanos como de animales (ratas) (Dobrzyńska et al. 2012; Swan et al. 2005). Se ha reportado el efecto potencial de DEHF, DBF, DEF, DMF y BBF en ratas. El DEHF presenta una concentración mínima de riesgo (0.5 mg/kg/d), asimismo, el DBF presenta un consumo tolerable menor (0.063 mg/kg/d) que los demás ftalatos para este mismo animal. La reacción de glucoronización facilita la excreción de los

ftalatos a través de la orina y reduciendo su potencial biológico (Lehmann et al. 2004; Latini 2005). Se ha identificado a uno de sus metabolitos más importantes, el mono etil-hexil ftalato (MEHF), como responsable de la toxicidad del DEHF. Las enzimas que rompen este aditivo químico en su metabolito MEHF se han encontrado fundamentalmente en el intestino, aunque también están presentes en el hígado, riñones, pulmones, páncreas y en el plasma de algunos organismos. El hecho de que la metabolización del DEHF ocurra en el tracto intestinal implica que la exposición vía ingestión podría ser más peligrosa que la intravenosa (Liu y Lin 2002; Okubo y cols. 2003).

El DBF y DEHF se consideran como promotores en la aparición de tumores, y la exposición a estos puede producir carcinoma hepatocelular, así como proliferación de los peroxisomas y mitocondrias, proliferación de los hepatocitos, supresión de la apoptosis, incremento del peso del hígado, niveles elevados de las enzimas hepáticas, cambios histológicos, entre otros (Heudorf et al. 2007; Dobrzyńska et al. 2012). Los humanos están expuestos a los ftalatos a través de la ingestión, inhalación y exposición (Adibi et al. 2003; Latini et al. 2003). La exposición dérmica y por inhalación son las más comunes cuando nos referimos a DBF, el cual es usado en productos de uso diario, a diferencia de otros ftalatos que son usados principalmente como plastificantes (DEHF) (Silva et al. 2003; Huber 1996). La mayor fuente de exposición a este tipo de ftalatos es por empaques de diferentes productos alimenticios (CERHR 2006; Fromme 2007; Borchers 2009). Otra fuente de exposición a ftalatos es a través de los dispositivos médicos que contienen DEHF (bolsas de almacenamiento, bolsas

de almacenamiento de sangre, juego de tubos, unidades de cuidados intensivos neonatales), especialmente en pacientes que se encuentran en terapia intensiva, que recibieron transfusión de plaquetas, hemodiálisis, cirugía cardiovascular, oxigenación por membrana extracorpórea, entre otros (Heudorf et al. 2007; Schettler et al. 2006; DiGanji 1999; Subotic et al. 2007). Sin embargo, estos compuestos pueden ser eliminados del ambiente gracias al sistema metabólico de algunos microorganismos como bacterias y hongos, capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía. Los hongos basidiomicetos presenta un sistema enzimático único y no específico extracelular siendo las enzimas lacasas las principales enzimas encargadas de la degradación de la lignina y otros compuestos orgánicos estructuralmente relacionados con los esterres de ftalato (Zeng y cols. 2004; Hwang y cols. 2008).

### **1.5. Hongos Basidiomicetos**

Los hongos del género basidiomiceto representan un grupo amplio y diverso que se caracteriza por producir esporas sexuales (basidiosporas) en cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos; este grupo está conformado por unas 20,000 especies, entre las cuales se encuentran los hongos comestibles conocidos como setas (Menéndez y Oliveros 2004). Los hongos de pudrición blanca son hongos saprófitos que adquieren sus nutrientes por mecanismo de absorción y no realizan fagocitosis debido a la rigidez de su pared celular. Sus hifas invaden los materiales de los cuáles se alimentarán, producen enzimas despolimerizadoras que degradan compuestos como la celulosa, la lignina y el almidón, hasta moléculas sencillas que pueden absorber. Esta actividad dentro de los procesos de degradación de la materia muerta o biodegradación de otros

compuestos es debida a las diferentes enzimas que producen, ya sea extracelularmente o en asociación con la capa que envuelve el exterior de la hifa (Deacon 1990; Sánchez 2009).

Los basidiomicetos poseen dos tipos de sistema enzimático: el sistema hidrolítico que producen hidrolasas, como las pectinasas (Xavier-Santos et al. 2004), proteasas, xilanasas, esterases y celulasas (Hwang et al. 2008; Goyal y Soni 2011; Hwang et al. 2012), las cuales son responsables de la degradación de polisacáridos. También poseen un sistema ligninolítico exclusivamente oxidativo, constituido principalmente por lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasas y oxidasas formadoras de peróxido de hidrógeno. Este sistema degrada la lignina y abre sus anillos fenólicos (Sánchez 2009). Estas enzimas ligninolíticas son producidas por estos hongos durante su metabolismo primario y secundario, ya que la oxidación de la lignina no proporciona ningún tipo de energía neta para el hongo, la síntesis y secreción de estas enzimas son a menudo inducidas por niveles limitados de nutrientes. La producción de estas enzimas varía de acuerdo con la cepa fúngica y las condiciones de cultivo (Tari et al. 2007).

### **1.5.1. Ciclo de vida de hongos basidiomicetos**

En el caso de los basidiomicetos, bajo condiciones fisiológicas y ambientales específicas, el micelio dicariótico comienza a formar estructuras reproductoras denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o

basidiocarpos) (Futoshi et al. 2004). En el ciclo de vida de estos organismos, se presentan tres fenómenos importantes (Moore-Landecker 1996; Herrera y Ulloa 1998):

\*Plasmogamia o anastomosis: Fusión de dos células del micelio que se aparean, a través de la cual los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común.

\*Cariogamia: Fusión de los núcleos.

\*Meiosis: División nuclear en la cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide al estado haploide. diploides.

En la Figura 2, se puede apreciar el ciclo de vida de las especies pertenecientes al género *Pleurotus* mediante el cual, la germinación de una basidiospora produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides quienes al ramificarse conforman al micelio, mismo que continúa creciendo de forma monocariótica hasta que pueda realizarse la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Después de que ambas células se fusionan, el septo o doliporo (que permanecía cerrado para evitar el intercambio intracelular) se abre para que pueda ocurrir la migración nuclear y posteriormente la formación del micelio secundario dicariótico mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicariones en las células hijas. Una vez formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por el crecimiento vegetativo, se llevan a cabo los procesos de cariogamia y meiosis. Como producto de este último, se obtienen núcleos haploides, que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio y una vez allí, son

liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpo maduro. Si encuentran condiciones ambientales apropiadas, estas basidiosporas germinan produciendo micelio monocariótico y comienzan nuevamente el ciclo (Larraya et al. 1999; Ramírez et al. 2000; Valencia del Toro 2002).

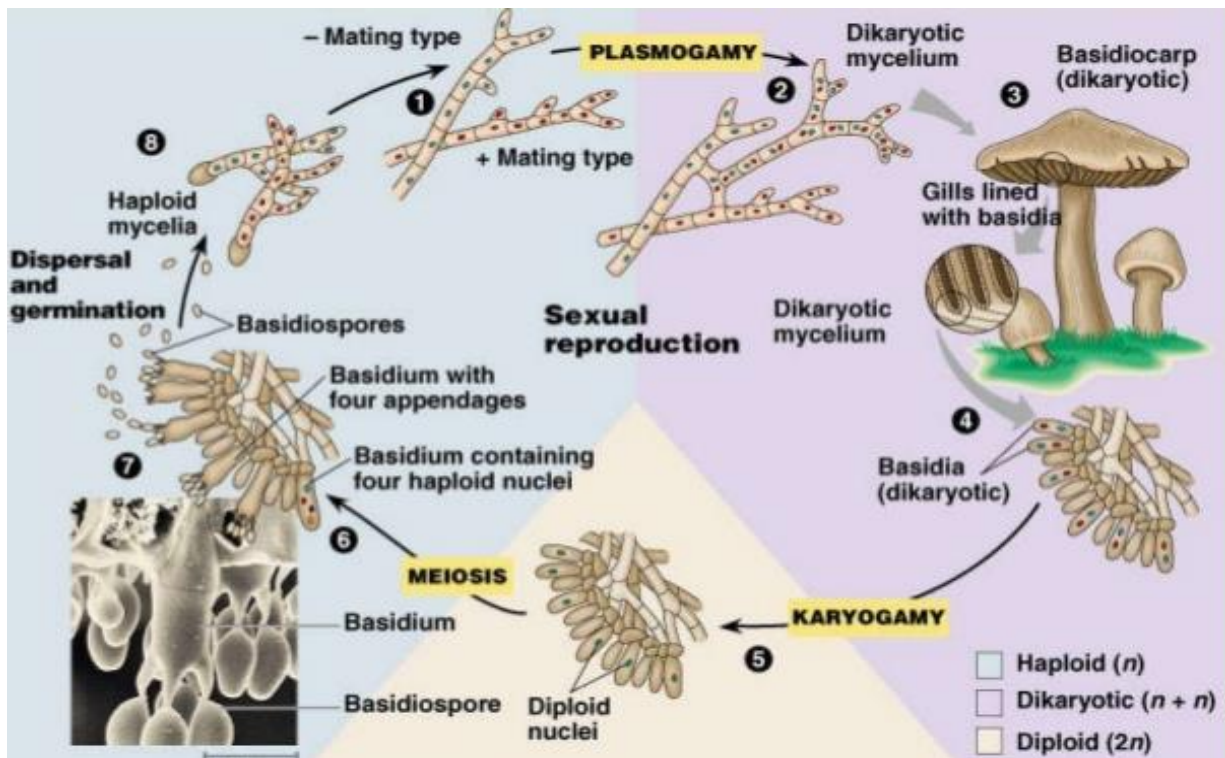


Fig. 2. Ciclo de vida de hongos basidiomicetos (Tari et al. 2007).

### 1.5.2. *Pleurotus ostreatus*

La palabra *Pleurotus* deriva del griego “pleuro” que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo. Por su parte, *ostreatus* en latín *significa* en forma de ostra, y se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Stamets y Chilton 1983). *Pleurotus* es un hongo saprófito, que

degrada la madera y crece abundantemente sobre árboles de los géneros *Alnus*, *Ochroma* y *Acer* (Mata y Salmones 2003).

## **1.6. Hongos Ascomicetos**

Los hongos del género ascomiceto como *Fusarium* producen dos o más tipos de esporas, las cuales pueden ser meióticas. Estas son consideradas esporas sexuales llamadas ascosporas. Estos hongos pueden producir uno o más tipos de esporas asexuales, generalmente llamadas conidios o clamidiosporas, en las etapas denominadas anamorfias, que se han clasificado en un phylum independiente (Deuteromycota) (Chaverri et al. 2003). Los ascomicetos o Ascomycota constituyen un grupo monofilético dentro de la división eumicetes del reino Fungi con más de 64,000 especies. Representa el mayor filo de hongos y uno de los más diversos y ubicuos de los eucariontes (Conrad et al. 2009). Habitan diversos medios como saprobios, parásitos y simbioses. Esta clase de hongos poseen enorme importancia científica, económica y práctica. El carácter esencial de estos hongos se debe a la formación de esporangios característicos de su estado reproductivo sexual, llamados ascas o ascos, en cuyo interior se generan esporas denominadas ascosporas (Fig. 3). Su talo puede ser unicelular, aunque generalmente está constituido por un micelio bien desarrollado, con hifas ramificadas y septadas, cuyas células poseen de uno a varios núcleos. Los ascomicetos llevan a cabo una reproducción sexual y asexual. El estado de reproducción asexual o conidial se denomina anamorfo y al sexual o ascógeno se le denomina teleomorfo (Fig. 3) (Herrera y Ulloa 1998).



En general, los hongos de la familia de los ascomicetos causan pudrición blanda. Los hongos causantes de la pudrición blanda utilizan un ataque similar al utilizado por los causantes de la pudrición marrón. Este tipo de hongos atacan la celulosa de las paredes celulares y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared secundaria celular (Schwarze et al. 2000). Muchos ascomicetos (particularmente el género *Aspergillus* y *Trichoderma*) presentan un sistema enzimático xilanolítico. Estas enzimas (en su mayoría extracelulares) se enlistan a continuación (Chávez et al. 2006):

- Endoxilanasas: hidrolizan al azar la cadena principal de xilano produciendo una mezcla de xilo-oligosacáridos.
- $\beta$ -xilosidasas: liberan xilosa de oligosacáridos cortos.
- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas: remueve cadenas laterales de L-arabinofuranosa.
- $\alpha$ -D-glucoronidasas: hidrolizan los residuos de glucoronato de metilo.
- Acetilxilanesterasas: hidrolizan grupos acetatos de la cadena principal.
- Ferulil y cumaril estererasas: hidrolizan los ácidos aromáticos respectivos unidos a residuos arabinofuranósidos.
- Cutinasas: hidrolizan la cutina de la plantas y enlaces éster.

#### **1.6.1. Ciclo de vida de hongos ascomicetos**

Los hongos ascomicetos representan el 75% de las especies fúngicas descritas hasta el momento. Sin embargo, las fases sexuales o teleomorfias han sido poco estudiadas

debido a que solo se han podido recuperar en cultivo puro el diez por ciento de las especies. La principal dificultad en el estudio de estos organismos es que se necesita interrumpir el estado de latencia de las ascosporas. Con este fin, se aplican diferentes métodos de aislamiento y de activación de ascosporas (Ingraham et al. 1995). El ciclo de vida de los ascomicetos, comprende la formación de hifas dicarióticas que tiene lugar como consecuencia de diversos procesos de reproducción sexual que llevan al apareamiento de núcleos (Fig. 3.). Tales procesos de reproducción pueden ser: contacto gametangial, espermatización y somatogamia. Una vez que el ascogonio está fecundado se empiezan a originar divertículos que reciben copias de los núcleos paternos y maternos y los organizan en hifas dicarióticas, con un núcleo de cada tipo por célula. Estas células suelen crecer y ramificarse dentro de los tejidos del futuro ascoma, integrados por hifas monocarióticas localizadas en las células situadas en el extremo de las numerosas ramificaciones de las hifas ascógenas donde tendrá lugar la cariogamia. Debido a la ramificación de las hifas dicarióticas, una sola fecundación inicial producirá un extenso número de cigotos, cada uno de los cuales actúa como una célula madre de un asca (Fig. 3.).

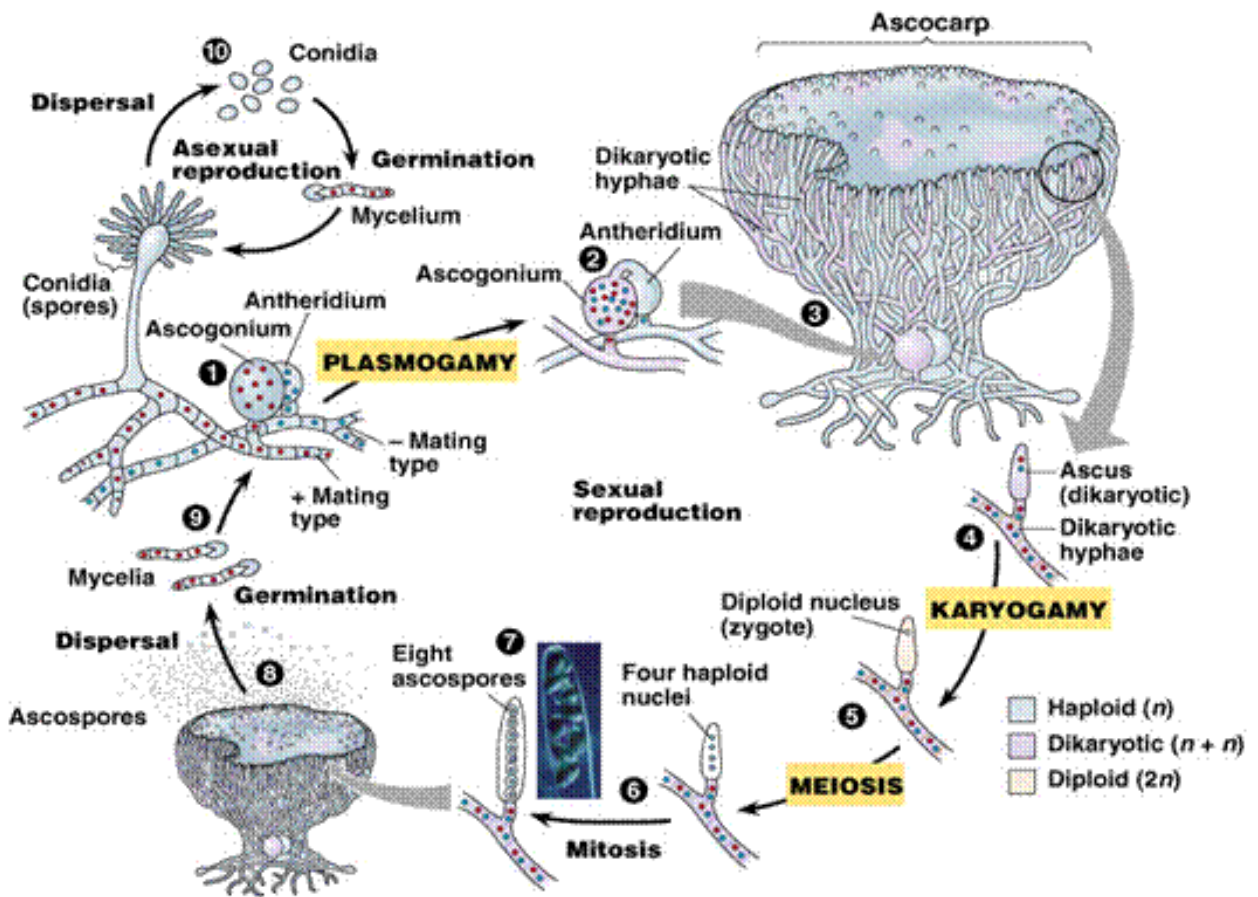


Fig. 3. Ciclo de vida de hongos Ascomicetos.

### 1.6.2. *Fusarium culmorum*

Es un hongo filamentoso que presenta conidióforos simples, cortos, tabicados que terminan con varios macroconidios, alargados y estrechos, curvados y con extremos, con cinco a ocho septos transversales y pared fina y lisa, los microconidios en esta especie se encuentran ausentes (Smith 2002). Presenta colonias de crecimiento rápido, vellosas, algodonosas, inicialmente blancas, y, en algunos medios de cultivo, con una pigmentación rosa en el centro que difunde a todo el cultivo (Fig. 4.) (Smith

2002). Las colonias pigmentadas tienen el centro rosa naranja intenso, con zona marginal rosa pálido y bordes blancos.

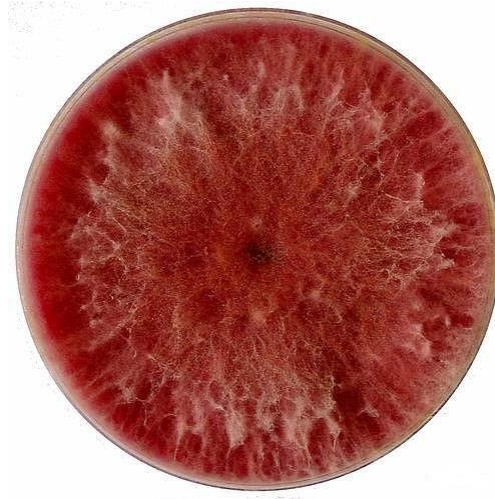


Fig. 4. Colonia de *F. culmorum* crecida en agar dextrosa-papa.

### 1.7. Enzimas lacasas

Las enzimas lacasas (*p*-difenol: dioxígeno oxidoreductasas; E.C. 1.10.3.2) son glucoproteínas y pertenecen al grupo más numeroso de las multicobre azul oxidasas (MCO), su peso molecular oscila entre los 25 y 80 kDa y su pH óptimo de actividad es de 4.5 (Díaz et al. 2013). Utilizan oxígeno como aceptor de electrones, para remover radicales de hidrogeno de grupos hidroxifenólicos (Gianfreda et al. 1999). Catalizan la eliminación de un átomo de hidrógeno en los grupos hidroxilo de las posiciones *orto* y *para*, sustituyendo sustratos monofenólicos, polifenólicos y aminas aromáticas por eliminación de un electrón para formar radicales libres capaces de despolimerizarse,

repolimerizarse, metilarse o formar quinonas (Abadulla et al. 2000). El producto inicial es inestable y puede sufrir una segunda oxidación catalizada enzimáticamente (conversión de fenol a quinonas) o una reacción no enzimática (como la hidratación o desprotonización) y/o puede participar en una reacción de polimerización, originando un producto amorfo insoluble como la melanina. Esas enzimas también son consideradas metaloglicoproteínas que contienen como cofactor iones de cobre que requieren para su actividad catalítica un mínimo de cuatro átomos de cobre por cada proteína activa (Claus 2004).

### **1.8. Enzimas esterasas**

Las esterasas son enzimas que pertenecen a la clase de hidrolasas, catalizando la ruptura y formación de enlaces éster. Pueden catalizar tres tipos de reacción: esterificación, interesterificación y transesterificación (Bhardwaj et al. 2012). Estas enzimas se dividen en:

- a) Carboxilesterasas, las cuales actúan sobre ésteres carboxílicos de cadenas acilo cortas (menor a 10 carbonos) liberando los ácidos correspondientes.
  
- b) Lipasas, catalizan la hidrólisis de ésteres de glicerol con una cadena acilo igual o superior a 10 átomos de carbono (insolubles en agua) a ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol.

c) Esterol esterasas, hidrolizan ésteres de esteroides liberando esteroides y ácidos grasos (NC-IUBMB 1992; Jaeger et al. 1999).

### **1.9. Biodegradación de ftalatos por hongos**

Los hongos poseen méritos en la biodegradación de compuestos tóxicos, por la habilidad de mineralización, oxidación de sustratos insolubles y secreción de enzimas extracelulares (Lee et al. 2007). Existen investigaciones acerca de la degradación de DBF de manera biológica (Hashizume et al. 2002). Se ha observado la efectividad del sistema ligninocelulósico de los hongos de pudrición blanca para degradar DBF a CO<sub>2</sub>. Este tipo de hongos muestran capacidades oxidativas para degradar varios contaminantes como compuestos clorados y fenólicos (ftalatos).

Otra forma de observar la biodegradación de ftalatos es utilizando hongos filamentosos. Se ha estudiado el crecimiento de hongos filamentosos en medio de cultivo extracto de malta-glucosa (YMG) adicionado con 100 mg/l de diferentes ftalatos (DEF, DMF y BBF). En este medio de cultivo, el DMF fue removido completamente por el hongo *P. ostreatus* en ocho días. Los hongos *Irpex lacteus* y *Trametes versicolor* MrP13 también removieron el 100% de DMP en 10 días. En la biodegradación de DEF, la mayoría de los hongos presentan una tasa baja de degradación comparándola con la de DMF. Sin embargo, *P. ostreatus* remueve completamente el DEF dentro de los ocho días como el DMF. El BBF fue degradado más rápidamente que DMF y DEF. *P. ostreatus* mostró la mayor tasa de degradación para los tres ftalatos antes

mencionados entre los diferentes hongos estudiados (Zeng et al. 2004; Hwang et al. 2008). También se ha observado que el hongo *P. ostreatus* es capaz de degradar completamente los 100 mg/l de BBF en el medio enriquecido YMG/L dentro de las primeras 24 horas de incubación en comparación con un medio mínimo en el cual solo llega a degradar el 35 % de este ftalato.

De manera similar, se han observado bajos niveles de degradación de BBF (30%) por otro hongo de pudrición blanca, *Phlebia tremellosa*, en un medio mínimo sin adición extra de fuente de carbono. Además, el pH del medio de cultivo tiene un efecto significativo en el crecimiento fúngico y en la actividad de las enzimas degradadoras de BBF. El pH del medio después de la adición de este ftalato se puede deber a la formación subsecuente de los metabolitos intermediarios de la degradación de BBF. En la biodegradación de este ftalato, el ácido ftálico se produce como el principal metabolito por lo que el pH del medio cambia. También se ha observado que la biomasa producida en el medio YMG/L conteniendo BBF es mayor que en aquel que no contiene ftalato, sugiriendo que *P. ostreatus* utiliza el ftalato como fuente de carbono (Xu et al. 2005; Yeo et al. 2007; Chang et al. 2007; Chatterjee y Dutta 2008; Hwang et al. 2012). El hongo *P. ostreatus* puede utilizarse en biorremediación de sitios contaminados por ftalatos (Kim y Song 2000; Linder et al. 2005; Hwang et al. 2012).

Existen enzimas que están implicadas en la biodegradación de ftalatos. Comparando con la enzima esterasa purificada de *Candida cylindracea*, la enzima cutinasa de *Fusarium oxysporum* mostró una actividad mayor en la hidrólisis de DEHF. La tasa de degradación de este ftalato fue notablemente mayor con la cutinasa fúngica. También

se ha reportado que esta enzima es capaz de hidrolizar también BBF (Kim et al. 2002), DBF (Kim y Lee 2006), DFF (Kim et al. 2005), DFF (dipentil ftalato) (Ahn et al. 2006) y DHF (dihexil ftalato) (Kim et al. 2007) de una manera eficiente (Kim et al. 2002) y la enzima cutinasa parece ser una enzima que actúa hidrolizando ésteres del ácido ftálico. Asimismo, se ha reportado que la enzima esterasa del género de los ascomicetos es capaz de hidrolizar enlaces éster (presentes en los ftalatos) y, además, los productos de degradación obtenidos a partir de esta no son tóxicos (Kim et al. 2002, Ahuactzin-Pérez et al. 2014).

#### **1.10. Cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC-MS)**

Esta técnica es usada para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La cromatografía de gases posee detectores universales (por ejemplo, el de ionización en llama) en comparación con la cromatografía líquida (HPLC). Además, los métodos son más simples, rápidos y más sensibles, así como la instrumentación requerida para la cromatografía es más sencilla y económica que la empleada en HPLC. Sin embargo, en cromatografía de gases, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, a diferencia de la cromatografía líquida. Por ello, la cromatografía de gases no puede detectar los compuestos si son compuestos poco volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a, compuestos sensibles a una elevación de la temperatura incluso moderada (determinados compuestos de interés biológico), compuestos que se encuentran en forma iónica.



Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los compuestos de la mezcla son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 400 °C. En cambio, cuando los compuestos a analizar son poco volátiles y/o termolábiles, la técnica separativa adecuada suele ser la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). A menudo la cromatografía de gases se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada. Esto se lleva a cabo por comparación del cromatograma de la sustancia pura con el de la muestra, siempre que las condiciones para la obtención de ambos sean idénticas. La mejor técnica de análisis cualitativo es aquella que combina la capacidad de separación de la cromatografía con la capacidad de la identificación de técnicas como la espectroscopía de masas (técnicas acopladas) (Gutiérrez y Droguet 2002).

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. Actualmente, las más empleadas son las columnas capilares. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los

compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (Fig. 5.). La técnica de GC-MS permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet 2002).

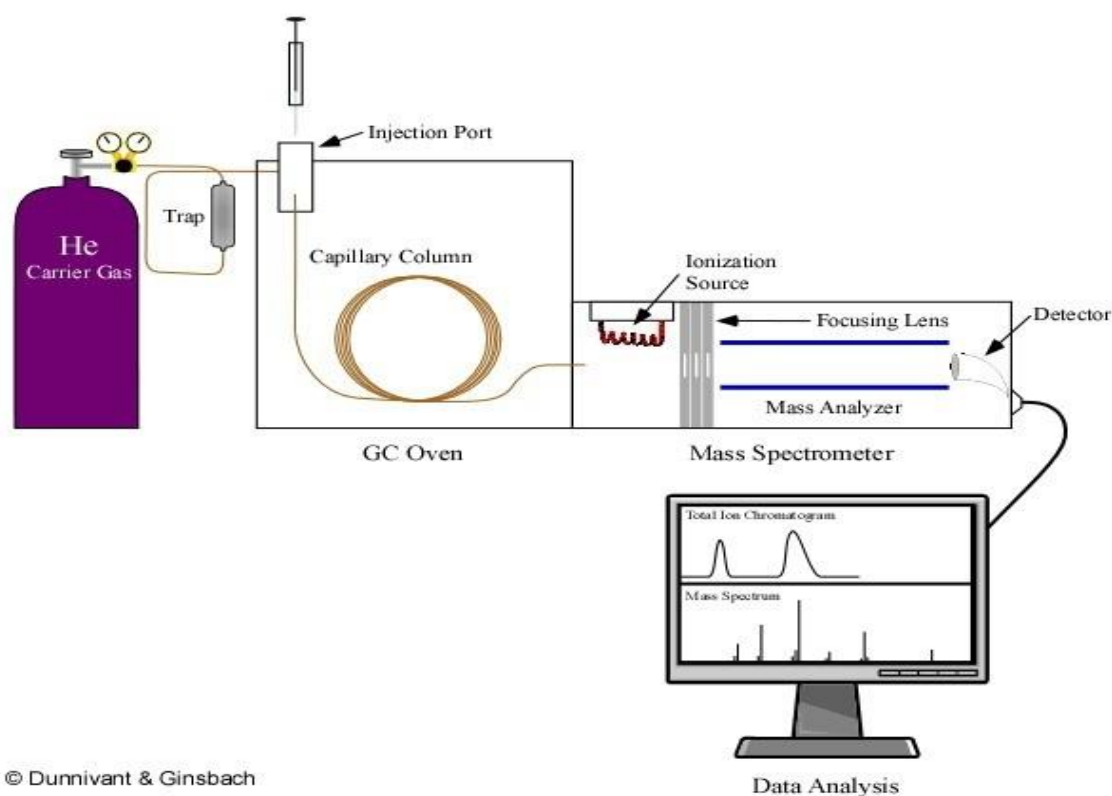


Fig. 5. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) (Universidad de Maine 2014).

### **1.11. Fermentación líquida**

La Fermentación líquida (FL) es un proceso en el que los microorganismos son inoculados en una suspensión acuosa de nutrientes (líquidos, solubles en agua o presentes en suspensión) produciendo biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas en ausencia o presencia de oxígeno (Fazenda et al. 2008). Este es el sistema más utilizado en la industria para la obtención y fácil purificación de sustancias bioactivas como las enzimas (Subramaniyam y Vimala 2012) debido a que es sencillo, pueden controlarse más variables, hay una mayor homogeneidad de cultivo, se pueden recuperar fácilmente los productos finales y se ha utilizado ampliamente en procesos de biorremediación (Akar y Divriklioglu 2010; Ertugay y Bayhan 2010). En este sistema, los hongos pueden formar pequeñas esferas de micelio (pellets) cuando hay agitación (Crueger y Crueger 1993), tal es el caso de algunos hongos de pudrición blanca que al crecer en FL exhiben diferente morfología en su crecimiento, desde agregados de micelio flotantes hasta densos pellets sedimentados (Grimm et al. 2005). A medida que los microorganismos descomponen los nutrientes liberan determinadas enzimas al medio acuoso.

## **2. ANTECEDENTES**

Tanaka et al. (2000), observó la degradación de DBF empleando la enzima lipasa de *Candida cylindracea* en un pH de 7. El producto de degradación (IBF) fue detectado por HPLC en 24 horas. La concentración de éste disminuyó en tres días y se degradó en ácido ftálico. En otro estudio, la biodegradación y actividad estrogénica del DBF fue caracterizada en sobrenadantes después de los cultivos de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Daldinia concentrica*. La eficiencia en la biodegradación se probó en 100  $\mu\text{M}$  de DBF y los productos de degradación fueron analizados por HPLC y GC/MS. La reducción del efecto estrogénico se realizó en estudios de proliferación de células MCF-7. De acuerdo con los resultados, se encontró que *D. concentrica* es capaz de crecer en altas concentraciones de DBF. Asimismo, se reportó que los productos de degradación de DBF por este hongo no incluían los productos que se reportan con más frecuencia como MBF y ácido ftálico (Lee et al. 2004).

Kim et al. (2007) utilizaron la bacteria *E. coli* para estudios de degradación y toxicidad de los productos de DEHF. En esta investigación, utilizaron 500 mg/l de DEHF. Observaron que el ftalato fue degradado alrededor del 90% por la acción de la enzima cutinasa (aislada de un *Fusarium oxysporum*). Encontraron que los productos de degradación utilizando cutinasa no resultaron tóxicos para la bacteria *E. coli* ya que no se encontró daño proteico ni estrés oxidativo.

En otra investigación, en la degradación de DBF por *P. brumalis*, se observó crecimiento micelial a los 12 días a tres diferentes concentraciones (250, 750 y 1250  $\mu\text{M}$ ). El principal producto de degradación resultó ser el ácido ftálico anhídrido. La tasa

de degradación de DBF se determinó por HPLC y los productos de degradación del DBF se determinaron por GC-MS. Utilizando esta última técnica, después de tres días de incubación, se reportó que los productos de degradación de DBF fueron dietilftalato (DEF), monobutil ftalato (MBF) y ácido ftálico anhídrido como intermediarios de la degradación (Lee et al. 2007).

Hwang et al. (2008) evaluaron la biodegradación de DEF, DMF y BBF en dos medios diferentes por 10 hongos de pudrición blanca (*P. ostreatus*, *Irpex lacteus*, *P. brumalis*, *Schizophyllum commune*, *Fomitella fraxinea*, *Merulius tremellosus*, *Trametes versicolor* y *T. versicolor* MrP1, MrP13 y MnP2-6) aislados en Corea. En este estudio, a una concentración de 100 mg/l de cada ftalato la degradación ocurre dentro de los primeros 12 días de incubación. Cuando los ftalatos son agregados después de 5 días de pre incubación de los hongos, la mayoría de éstos, excepto *I. lacteus* mostraron un incremento en la remoción de los ftalatos en comparación con aquellos que no tuvieron un tiempo de cultivo previo a la adición de los ftalatos. En ambos cultivos *P. ostreatus* mostró las mayores tasas de degradación para los tres ftalatos, lo que puede atribuirse a las enzimas que se encuentran asociadas al micelio. También se observó que la actividad estrogénica del DMF decreció durante su biodegradación por este hongo.

En un estudio similar, Chai et al. (2008) evaluaron la degradación de DOF (dioctil ftalato) por 14 cepas de hongos en fermentación líquida, en donde encontraron que nueve degradaban más del 50% a una concentración inicial de 40 mg/l; y de éstas, *F. oxysporum* fue el hongo que degradó eficientemente el 98% del ftalato a los siete días de fermentación. Por otra parte, las cepas de hongos aislados de suelo y desarrollados

sobre DEHF mostraron producción de biomasa después de 20 días de fermentación en los cultivos que contenían 0.05 ml de DEHF como única fuente de carbono y energía por 50 ml de medio de cultivo (Sánchez 2009).

En un estudio realizado por Zhu-Hua et al. (2012), dos cepas de hongos (*Fusarium* sp. DMT-5-3 y *Trichosporon* sp. DMI-5-1) que presentaron la capacidad para degradar ésteres de DMF fueron aisladas a partir de sedimentos de manglares en la Reserva Natural de Futian Shenzhen, China. En este trabajo, se observó que ambos hongos no podían mineralizar completamente los ésteres de ftalato (EFs) pero sí transformarlos a sus respectivos monometil ftalato o ácido ftálico. Las rutas bioquímicas de degradación para los diferentes isómeros de los EFs fue diferente en los dos hongos utilizados, ambos pudieron transformar DMF a monometil tereftalato (MMF) y posteriormente a ácido tereftálico (AT) por hidrólisis gradual de dos enlaces éster. Sin embargo, no pudieron llevar a cabo una etapa de hidrólisis para la ruptura de un éster y transformar el DMF en monometil isoftalato (MMI). Estos resultados sugieren que las esterasas fúngicas responsables del hidrólisis de dos enlaces éster son altamente específicas para su sustrato.

Hwang et al. (2012) evaluaron la degradación de BBF y la actividad de las enzimas que participan en ésta por el hongo *P. ostreatus* en dos diferentes medios (YMG/L y medio mineral); encontrando que la degradación de BBF a 100mg/l fue completa en medio YMG/L en comparación con el medio mineral, en el cual sólo se degradaron 35mg/l de ftalato. La actividad enzimática presentó una relación diferente para cada enzima con el medio de cultivo y la concentración de los ftalatos, ya que la actividad

esterasa fue mucho mayor en medio YMG/L que en medio mineral, además de que incrementó con la adición de BBF; situación contraria a las lacasas, que presentaron mayor actividad en medio mineral pero no se incrementó dicha actividad con la adición de BBF.

Ahuactzin-Pérez et al. (2014) estudiaron la biodegradación de DBF a 500 y 1000 mg/l /l utilizando los hongos *Neurospora sitophyla*, *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger* en fermentación líquida. A partir de los sobrenadantes obtenidos de las fermentaciones, evaluaron la toxicidad de los metabolitos obtenidos del proceso de degradación mediante el monitoreo del crecimiento de la bacteria *E. coli*. Encontraron que los productos de degradación obtenidos con *N. sitophyla* inhibieron el crecimiento de *E. coli* a mayor concentración de DBF, en contraste con *T. harzianum* y *A. niger*, en donde se observó mayor crecimiento de *E. coli* en la menor concentración de DBF.

Córdoba-Sosa et al. (2014a) evaluaron el crecimiento de *P. ostreatus* ATCC3526 en tres diferentes concentraciones de DEHF (750, 1200 y 1500 mg/l) en FL encontrando que esta cepa es capaz de crecer en concentraciones de hasta 1500 mg/l /l (concentración más alta reportada en estudios de biodegradación de DEHF). Además las diferentes concentraciones del DEHF tienen efecto tanto sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) como en la biomasa máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ), ya que a mayor concentración de DEHF se incrementó la producción de biomasa. La mayor actividad enzimática la presentaron las enzimas esterases en comparación con las lacasas, además el rendimiento enzimático evaluado para ambas enzimas presentó una correlación positiva con la actividad máxima obtenida. Dado que la actividad de

esterasas fue mucho mayor que la actividad de la lacasas al comienzo de la fase estacionaria en el medio que contenía DEHF a 1500 mg/l/l, lo que sugiere que en este basidiomiceto, este grupo de enzimas podría ser el responsable de degradación inicial de DEHF. Esta cepa es capaz de utilizar DEHF como fuente de carbono y energía.

Whangsuk et al. (2015) reportaron dos genes clonados de esterasa, estB y estG, en *Sphingobium* sp. SM42, que podrían participar durante el metabolismo de DBF como única fuente de carbono. A pesar de que la esterasa estG comparte una identidad de secuencia con muy pocas proteínas, mostró una mayor capacidad de ruptura para DBF, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con estB. Las mutantes de inactivación de inserción estG y estB no pudieron degradar DBF debido principalmente a la ausencia de la eficiente enzima degradadora de DBF, estG. La mutante estB degradó DBF mejor que la cepa nativa. Estos resultados confirmaron que la mutante estB compensa la pérdida de estB con un aumento en la expresión de estG y este proceso permite a *Sphingobium* degradar eficientemente DBF. Un gen designado estR, que codifica una proteína de la familia MarR, fue encontrado cerca de estB; reportando que la proteína EstR actúa como regulador transcripcional positivo que media la inducción de la expresión del gen de esterasas estB, pero no está implicado en el aumento compensatorio observado en la expresión de estG en la mutante estB.

Yeo et al. (2008) evaluaron el incremento en la expresión de la enzima lacasa de *Phlebia tremellosa* crecido sobre diferentes disruptores endócrinos: DEF, BBF y bisfenol A (BFA). Observaron que *P. tremellosa* degradó hasta un 30 % al BBF y un 80 % al DEF bajo condiciones de cultivo líquido durante nueve días. Estos ésteres de



ftalato, incrementan hasta 10 veces más la actividad de lacasas con respecto al medio control y al medio que contiene BFA. También muestran que al amplificarse el ADNc de la enzima lacasa de *P. tremellosa* mostró una similitud del 80.7 % cuando se compara con una lacasa de *Phlebia radiata* y un 64.8% de identidad en comparación con la *T. versicolor*. Al ser cultivado este hongo en condiciones adecuadas para la degradación de ésteres del ácido ftálico, la actividad de lacasas y su nivel de transcripción fueron superiores.

Díaz et al. (2013) determinaron el patrón de actividad intra y extracelular, así como la expresión de las isoformas extracelulares (lacc 1, lacc 4, lacc 6, lacc 9 y lacc 10) de lacasas de *P. ostreatus* crecido bajo diferentes pH de crecimiento y mediante diferentes pH de actividad. En esta investigación, obtuvieron 77550 U/l a pH de 4.5 como actividad máxima de lacasas extracelulares. También se muestra la actividad intracelular con valores máximos en las fermentaciones de pH de 4.5 y 6.5 (4800 y 1741 U/g de biomasa seca, respectivamente). Al llevar a cabo el patrón de expresión empleando la técnica de RT-PCR, se observaron diferencias en el tiempo y nivel de expresión de los 5 genes. Los autores muestran que Lacc 9 no se expresó en ninguna condición de desarrollo y actividad. Sin embargo, en la fermentación de pH de 3.5 de crecimiento, se expresaron con una mayor intensidad los genes de las isoformas: lacc 4, lacc 6 y lacc 10. Mientras que en la fermentación a pH de 6.5 de crecimiento, todos los genes mostraron el mismo nivel de expresión. Los autores mencionan que el pH de desarrollo del hongo es un factor que modifica el patrón de producción y expresión de las lacasas.

Choi et al. (2010), estudiaron el efecto de DEHF en proteínas secretadas por HEpG2 (liver hepatocellular carcinoma). Estas células fueron expuestas a varias concentraciones de DEHF (0, 2.5, 10, 25, 50, 100 y 250 mM) por 24 o 48 horas. Se determinó la citotoxicidad y genotoxicidad de este ftalato. Se encontró que la concentración a de 10mM de DEHF fue la máxima concentración que no causa muerte celular. Además, el daño al DNA de las células HepG2 expuestas a DEHF incrementa de acuerdo a la dosis y al tiempo de exposición. Se identificaron tipos de proteínas como biomarcadores de DEHF, así como grupos de proteínas involucradas en apoptosis, transporte, señalización, energía, metabolismo y estructura celular y motilidad.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los ftalatos son contaminantes del medio ambiente y tóxicos para el humano. Se sabe que estos compuestos son cancerígenos, teratógenos y mutagénicos. Asimismo, se conoce que el sistema enzimático de hongos del género ascomiceto y basidiomiceto es efectivo en la degradación de xenobióticos fenólicos (e.g. ftalatos). En la actualidad, existen pocos estudios acerca de las rutas metabólicas de degradación de este tipo de compuestos empleando hongos filamentosos. Por lo que, en esta investigación, se proponen rutas de degradación de estos contaminantes utilizando *P. ostreatus* y *F. culmorum*.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las enzimas de *Pleurotus ostreatus* y *Fusarium culmorum* serán inducidas por la presencia de DEHF y DBF en el medio de cultivo, lo que incrementará el porcentaje de biodegradación y la eficiencia de remoción de dichos compuestos?

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Evaluar la biodegradación de DEHF y DBF por cepas de hongos filamentosos crecidos en fermentación líquida, así como identificar los productos de la degradación empleando la técnica de GC-MS para proponer las rutas metabólicas que participan durante la degradación.

##### **5.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar el crecimiento de *P. ostreatus* y *F. culmorum* crecidos en fermentación líquida conteniendo DEHF y DBF a concentraciones de 500 mg/l y 1000 mg/l.

- Evaluar la biodegradación de 500 y 1000 mg/l de DBF y DEHF empleando *P. ostreatus* y *F. culmorum*, así como la caracterización de los productos generados que permita proponer una ruta metabólica de biodegradación.

Determinar la actividad específica de las enzimas de lacasas y estererasas producidas por *P. ostreatus* y *F. culmorum* crecidos en fermentación líquida conteniendo 500 y 1000 mg/l de DEHF y DBF, respectivamente.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Organismos de estudio**

Dos cepas de hongos fueron empleadas en este estudio, *P. ostreatus* y *F. culmorum* de la colección de cultivos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. Se utilizó *P. ostreatus* 50 de la colección de cultivos del COLPOS campus Puebla y *F. culmorum* aislada de la etapa de pulpeo de una industria recicladora de papel (Aguilar-Alvarado et al. 2015). Las colonias de hongos se crecieron en agar de extracto de malta (Difco) a 20 °C y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

### **6.2. Preparación de inóculo y condiciones de cultivo**

El inóculo se tomó de la periferia de estas colonias (3 fragmentos de 4 mm de diámetro). Los cultivos se incubaron a 28 °C por 25 días a 120 rpm en el caso de *P. ostreatus* y para *F. culmorum* durante 12 días.

### 6.3. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon 5 medios de cultivo líquidos para ser inoculados por cada cepa de hongos: 1) extracto de levadura glucosa (GYE), 2) GYE + 500 mg/l DEHF, 3) GYE + 1000 mg/l DEHF, 4) GYE + 500 mg/l de DBF y 4) GYE + 1000 mg/l de DBF. Cada medio contenía (en g/l) 10 de glucosa, 5 de extracto de levadura, ,0.5 de MgSO<sub>4</sub> ,0.4 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 de CuSO<sub>4</sub>, 0.05 de FeSO<sub>4</sub>, 0.05 de MnSO<sub>4</sub> y 0.001 de ZnSO<sub>4</sub>. El pH se ajustó a 6.5 usando 0.1 M de HCl o NaOH, respectivamente. Todos los medios contenían 400 µ de Tween 80 por litro. Se emplearon matraces de 125 ml conteniendo 50 ml de cada respectivo medio de cultivo y se esterilizaron a 120 °C por 15 min a 15 lb de presión, se dejaron enfriar para su posterior inoculación. En todos los casos, los medios GYE fueron utilizados como testigo.

### 6.4. Producción de biomasa, parámetros cinéticos de crecimiento y perfiles de pH

La biomasa (X) se obtuvo por filtración de las muestras utilizando papel filtro Whatman No. 1 (tamaño de poro de 20 a 25 micras). Para determinar los parámetros de crecimiento se considera la evolución de la biomasa  $X=X(t)$  por la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Viniegra-González et al. 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left( \frac{1 - X}{X_{m\acute{a}x}} \right) X$$

La solución de la ecuación logística se indica a continuación:

$$X = X_{m\acute{a}x} (1 + C \exp^{-\mu t})$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $X_{m\acute{a}x}$  es el valor de biomasa máxima o de equilibrio.

Se estimó el rendimiento de la biomasa por el sustrato ( $Y_{X/S}$ ) como el coeficiente de la regresión lineal de biomasa frente a la concentración de sustrato en gramos de biomasa/g de sustrato consumido (Córdoba-Sosa et al. 2014a, 2014b). Se midió el pH cada 12 h en el sobrenadante de los cultivos usando un potenciómetro digital (Hanna Instruments, México).

## **6.5. Actividad enzimática**

### **6.5.1. Obtención del sobrenadante**

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizaron los sobrenadantes obtenidos después de la filtración del micelio. Se recolectaron 5 ml de cada réplica por cada día de fermentación, estos se congelaron a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se guardaron hasta su posterior uso. El resto del sobrenadante se sometió a un tratamiento de choque térmico a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 min, con la finalidad de desnaturalizar todas las enzimas presentes en el sobrenadante y así evitar que continúen con su acción catalítica.

### **6.5.2. Actividad enzimática de lacasas**

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustrato el 2,6-dimetoxifenol (SIGMA) 2mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0. La mezcla de reacción (475  $\mu$ l de sustrato, 50  $\mu$ l de ECE) se incubó a 39°C por 15 min. La reacción se detuvo por la adición de 475 $\mu$ l de dimetil sulfóxido (SIGMA). Se leyó la absorbancia a 468 nm. Una unidad de actividad de lacasas es la cantidad de enzima que provoca incrementos de 1.0 unidad en la absorbancia por min de incubación (Díaz et al. 2013)

### **6.5.3. Actividad enzimática de esterasas**

La actividad de esterasas se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la hidrólisis de *p*-nitrofenilbutirato (PNPB) a 405 nm. La mezcla de reacción contenía 0.070 ml de extracto enzimático y 3.43 ml de la mezcla que a continuación se detalla: 0.56 ml de PNPB disuelto en 50 mM de buffer de fosfatos a pH 7, 0.2 % de Tritón X-100 y 0.43 M de tetrahidrofurano. La curva de calibración se realizó con *p*-nitrofenol. Una unidad de actividad de esterasas se define como la cantidad de esterasas requeridas para liberar un micromol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo (Macedo y Fontes 2005).

#### **6.5.4. Parámetros cinéticos enzimáticos**

El rendimiento de la enzima por unidad de biomasa producida ( $Y_{E/X}$ ) por cada cepa de hongos se estimó como la relación entre la actividad enzimática máxima obtenida durante el crecimiento exponencial ( $E_{m\acute{a}x}$ ) y la  $X_{m\acute{a}x}$ . La productividad enzimática ( $P = E_{m\acute{a}x}/h$ ) se evaluó utilizando el tiempo (h) en el momento que la actividad enzimática fue la máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ). La tasa específica de formación de la enzima se calculó a partir de la ecuación:  $q_p = (\mu) (Y_{E/X})$  (Díaz et al. 2011; Córdoba-Sosa et al. 2014a, 2014b).

#### **6.6. Determinación del consumo de glucosa**

Se cuantificó la cantidad de azúcares reductores por el método DNS (ácido dinitro salicílico), a 50  $\mu$ l del sobrenadante y 950  $\mu$ l de agua destilada se le agregó 2 ml del reactivo DNS (hidróxido de sodio 1%, sulfito de sodio 0.05%, fenol 0.2% y DNS 1%). La solución de reacción se sometió a ebullición por 5 min, posteriormente de enfriarse se leyó a una absorbancia de 575 nm de longitud de onda (Miller 1959). Se preparó una curva de calibración con glucosa.

#### **6.7. Análisis de cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas**

Se colocó 1 ml de los sobrenadantes correspondientes a cada día de fermentación, de cada cepa de hongo de cada medio de cultivo adicionado con uno de los dos ftalatos a 95 °C durante 2 min en un agua baño (para desnaturalizar las proteínas). Los



productos intermedios de la biodegradación del DEHF y DBF se analizaron por GC/MS, utilizando un GC/MSD cromatógrafo de gases Agilent 890<sup>a</sup> acoplado a un espectrómetro de masas (MSD 5975C VL, EE.UU.) Equipado con un detector de triple eje y una columna capilar Agilent (HP-5MS, EE.UU.) con 5% de fenilo siloxano de metilo (325 °C, 30 m, 320 µm, 0.25 µm). Se inyectó una alícuota de 2 µl de la ST a partir de cultivos con una fuente de inyección (GC ALS) a una temperatura puerto de 300 °C con la válvula de purga en (modo dividido), utilizando una relación de división de 20:1 y flujo dividido de 21.14 ml/min. Las siguientes condiciones cromatográficas se utilizaron: temperatura del horno inicial de 90 °C, se mantuvo durante 5 min, rampa hasta 20 °C/min a 290 °C y, la siguiente, se mantuvo durante 15 min usando una jeringa de 10 µl de volumen división de 20:1 a 300 °C en el inyector. El helio fue utilizado como gas portador a 1.057 m/min. Los espectros de masas se obtuvieron en modo de exploración dentro de un rango de  $m/z$  25-550 usando un umbral de 150 y el factor de ganancia de 1. La ionización se realizó por impacto electrónico a 1870.588 eV con una calibración mediante la sintonización automática y Espectrometría de masas con el patrón interno FC-43. La temperatura de la fuente de iones y la temperatura del cuádruplo fueron de 230 °C y 150 °C, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software MSD ChemStation (Agilent Technologies), los compuestos se identificaron utilizando la biblioteca Nist MS 2.0. partiendo del compuesto mayor de 90%.

## 6.8. Biodegradación y la eficiencia de remoción de los ésteres de ftalato

La biodegradación de DEHF o DBF se determinó midiendo la desaparición de estos compuestos en los cultivos. Se ha reportado que el porcentaje de biodegradación (% BD) en el intervalo de tiempo  $t$  (h) puede calcularse empleando la siguiente formula:

$$\%BDt = \frac{C_t}{C_0} \times 100$$

donde  $C_0$  = concentración inicial del DEHF o DBF en la solución de ensayo (mg/l).  $C_t$  = concentración de DEHF o DBF en la solución de ensayo en el tiempo  $t$ .

Se aplicó una regresión lineal utilizando el tiempo de fermentación en comparación con el logaritmo natural (ln) de la concentración de DEHF o DBF. La pendiente de tales regresiones se consideran la constante de biodegradación de primer orden de ( $k$ ) expresada en  $h^{-1}$  (Kim et al. 2007).

La eficiencia de eliminación del DEHF o DBF se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ eficiencia de remoción} = 1 - C_t/C_0 \times 100$$

## 6.9. Modelo de química cuántica

Las rutas de biodegradación de DEHF y DBF propuestas se propusieron con base en los compuestos identificados por GC/MS como intermediarios de ambos compuestos y utilizando parámetros de química cuántica. Estos parámetros fueron  $E_{HOMO}$  (electron Volts; eV),  $E_{LUMO}$  (eV),  $\delta^+$  (carga del electrón/angstrom;  $ec/\text{Å}$ ),  $\delta^-$  ( $ec/\text{Å}$ )  $E_{Bg}$  (eV),  $E\delta$  ( $ec/\text{Å}$ ) y el ETC ( $eV\text{Å}/ec$ ) de cada compuesto y se calcularon usando el modelo de SE-PM3 (Odunola y Semire 2007; González-Pérez et al. 2014). Todos los cálculos se

llevaron a cabo usando parámetros específicos de simulación previamente reportados (González-Pérez et al. 2014).

## **6.10. Análisis estadístico**

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se evaluaron los datos mediante un ANOVA de una vía y posterior a la prueba de Tukey utilizando el programa The Graph Pad Prism® program (San Diego, CA, USA) (Córdoba-Sosa et al. 2014a; 2014b).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Crecimiento de *P. ostreatus* y *F. culmorum* en fermentación líquida y consumo de la glucosa en los sobrenadantes**

#### **7.1.1. Crecimiento de *P. ostreatus* y consumo de glucosa en los medios adicionados con DEHF**

La producción de Biomasa (X) en los tres diferentes medios de cultivo conteniendo DEHF se muestra en la Figura 6. Esta cepa presentó tres fases de crecimiento en los tres medios de cultivo probados en el tiempo establecido de incubación (fase de adaptación, exponencial y estacionaria).

En la Figura 6 se muestra la producción de biomasa y el consumo de glucosa por *P. ostreatus*. La mayor producción de biomasa fue observada en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, sin embargo, el aumento en la producción de  $X_{\text{máx}}$  fue directamente proporcional al aumento de la concentración de DEHF (Tabla 1). Con respecto al consumo de glucosa, en el medio GYE el consumo total se mostró a las 240 h de la fermentación, mientras que en los medios 500 y 1000 mg/l de DEHF en el mismo tiempo sólo se consumió un 85 y 75 %, respectivamente. En todos los medios el consumo total de glucosa corresponde al inicio de la fase exponencial de cada fermentación.

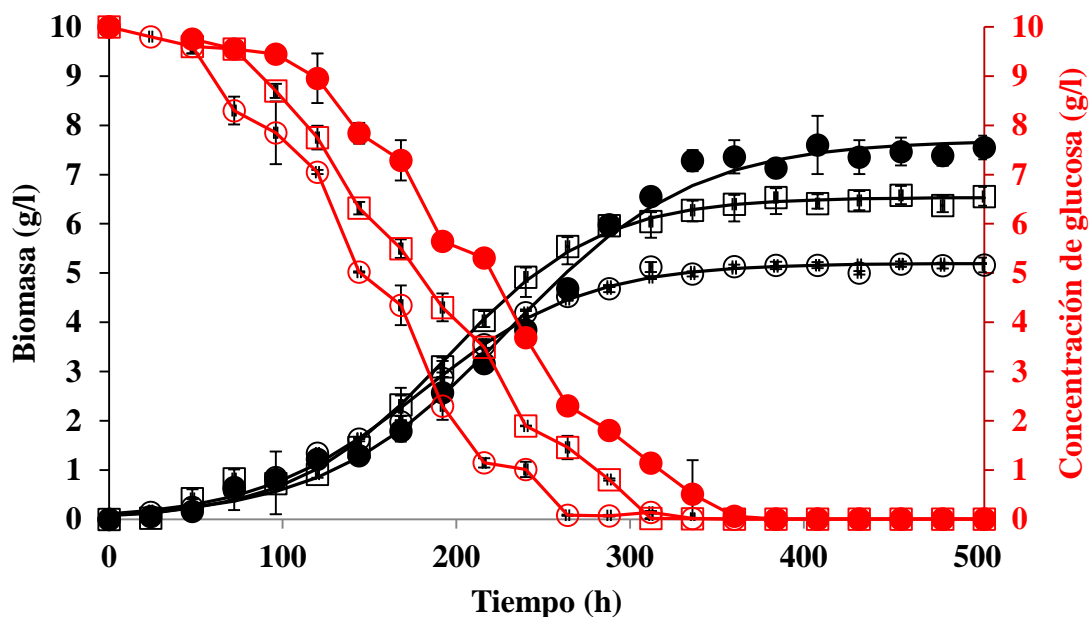


Fig. 6. Crecimiento de *P. ostreatus* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida y consumo de glucosa en el medio de GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF.

### **7.1.2. Crecimiento de *P. ostreatus* y consumo de glucosa en los medios que contienen DBF**

En la Figura 7 se muestra la producción de biomasa y el consumo de glucosa por *P. ostreatus* en los medios con glucosa y los medios con adición de DBF. La mayor  $X_{m\acute{a}x}$  fue observada en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, seguido por el medio de 500 mg/l de DBF y teniendo la menor  $X_{m\acute{a}x}$  en el medio GYE (Tabla 2). El consumo de glucosa en todos los tratamientos se dio en un 100 %, sin embargo, en diferentes tiempos del crecimiento de *P. ostreatus*. En el medio GYE el 100 % del consumo se presentó a las 360 h, sin embargo, en el medio de 500 y 1000 mg/l de DBF el consumo al mismo tiempo fue del 90 y 78 %, respectivamente. *P. ostreatus* mostró el inicio de la fase estacionaria a las 360, 384 y 456 h en los medios GYE, 500 y 1000 mg/l de DBF, respectivamente (Fig. 7).

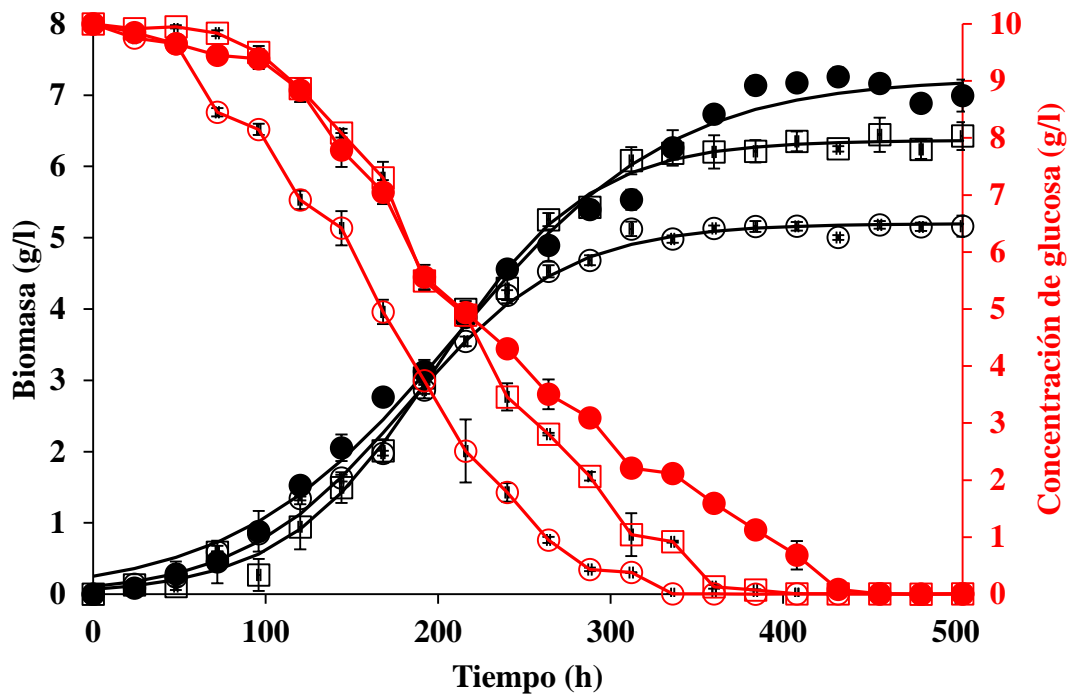


Fig. 7. Crecimiento de *P. ostreatus* en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida y consumo de glucosa en el medio GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF.

### 7.1.3. Crecimiento de *F. culmorum* y consumo de glucosa en los medios que contienen DEHF

La producción de Biomasa y el consumo de glucosa en el medio GYE y en los medios que contienen DEHF se muestran en la Figura 8. *F. culmorum* presentó tres fases de crecimiento de un microorganismo para los tres medios de cultivo probados en el tiempo establecido de incubación (fase de adaptación, exponencial y estacionaria).

La mayor  $X_{m\acute{a}x}$  fue observada en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguido por el medio de 500 mg/l de DEHF, obteniendo la menor  $X_{m\acute{a}x}$  en el medio GYE (Tabla 3). *F. culmorum* consumi3 en todos los medios de cultivo el 100 % de la glucosa a las 144 h de crecimiento, sin embargo, se observa que las 108 h de crecimiento, tiempo en el que el hongo entr3 a la fase estacionaria en los tres medios de cultivo, el consumo de glucosa varía teniendo que en el medio de 1000 mg/l de DEHF, el consumo es del 25 %, en el medio de 500 mg/l de DEHF es de 15 % y para el medio GYE del 11 % (Fig. 8).

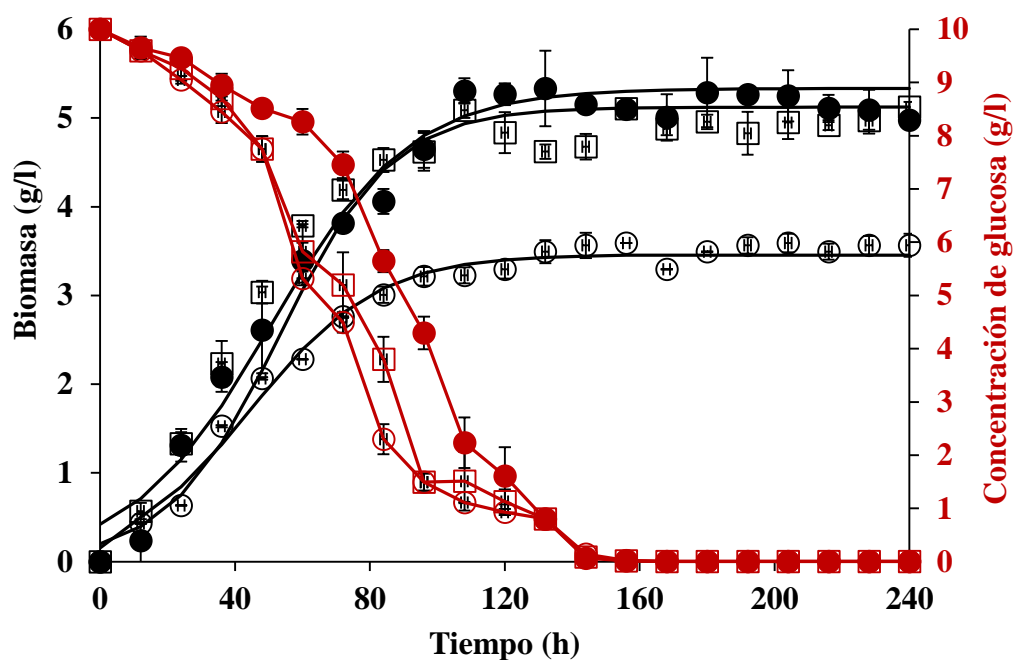


Fig. 8. Crecimiento de *F. culmorum* en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida y consumo de glucosa en los medios GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF.

#### **7.1.4. Crecimiento de *F. culmorum* y consumo de glucosa en los medios adicionados con DBF**

La producción de Biomasa ( $X$ ) en los tres diferentes medios de cultivo conteniendo DBF se muestra en la Figura 9. La cepa de *F. culmorum* inicio la fase estacionaria en el medio GYE a las 108 h de incubación. Esta fase antes mencionada se observa a las 84 h tanto para el medio de cultivo de 500 y 1000 mg/l de DBF respectivamente. El consumo del 100 % de la glucosa se muestra a diferentes tiempos de fermentación para los medios GYE, 500 y 1000 mg/l de DBF se mostró a las 132 h, 144 h y 120 h de crecimiento, respectivamente. Con base en la producción de biomasa, la mayor  $X_{\text{máx}}$  se presentó en el medio que contiene 1000 mg/l de DBF, seguido del medio de 500 mg/l de DBF y GYE (Tabla 4).



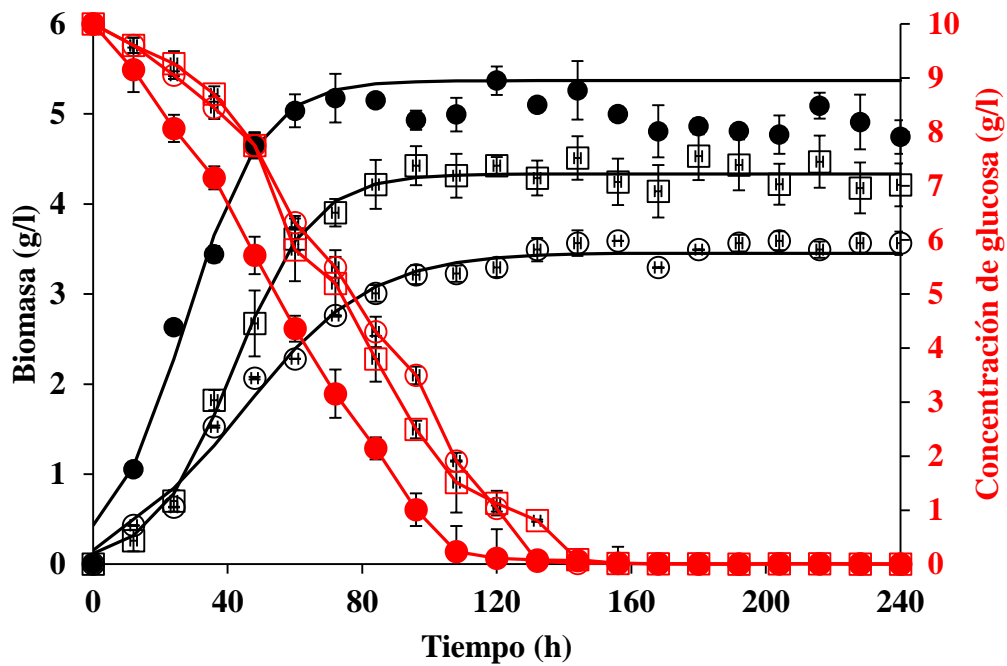


Fig. 9. Crecimiento de *F. culmorum* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida y consumo de glucosa en los medios GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF.

## 7.2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y *F. culmorum*

### 7.2.1. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DEHF.

El mayor valor de  $\mu$  se mostró en los medios de 500 mg/l de DEHF y GYE, seguido por el medio de 1000 mg/l de DBF (Tabla 3). El mayor valor de  $X_{m\acute{a}x}$  y del  $Y_{X/S}$  se mostró en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF y disminuyen ambos parámetros conforme disminuye la concentración del DEHF (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecido en fermentación líquida conteniendo DEHF.

Parámetro	Medio de cultivo		
	DEHF (mg/l)		
	GYE	500	1000
$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	5.19 <sup>c</sup> (0.03)	6.53 <sup>b</sup> (0.01)	7.69 <sup>a</sup> (0.02)
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.021 <sup>a</sup> (0.0003)	0.022 <sup>a</sup> (0.002)	0.018 <sup>b</sup> (0.0007)
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.519 <sup>c</sup> (0.02)	0.653 <sup>b</sup> (0.001)	0.769 <sup>a</sup> (0.01)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

### 7.2.2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DBF

La mayor  $\mu$  se mostró en los medios GYE y 500 mg/l de DBF, seguido en el medio 1000 mg/l de DEHF (Tabla 2). La mayor  $X_{m\acute{a}x}$  fue observada en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, seguido por el medio de 500 mg/l de DBF y mostrando la menor

$X_{m\acute{a}x}$  en el medio GYE (Tabla 2). El mayor valor del  $Y_{X/S}$  se mostr3 en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, este par3metro al igual que la  $X_{m\acute{a}x}$  conforme disminuye la concentraci3n de DBF (Tabla 2).

Tabla 2. Par3metros cin3ticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecido en fermentaci3n l3quida conteniendo DBF.

Par3metro	Medio de cultivo		
	DBF (mg/l)		
	GYE	500	1000
$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	5.19 <sup>c</sup> (0.03)	6.36 <sup>b</sup> (0.061)	7.32 <sup>a</sup> (0.073)
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.021 <sup>a</sup> (0.0003)	0.022 <sup>a</sup> (0.0002)	0.015 <sup>b</sup> (0.0008)
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.519 <sup>c</sup> (0.001)	0.636 <sup>b</sup> (0.012)	0.769 <sup>a</sup> (0.022)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). N3meros entre par3ntesis corresponden a la desviaci3n est3ndar de tres r3plicas en el experimento.

### 7.2.1. Par3metros cin3ticos de crecimiento de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

En la siguiente tabla se muestra los par3metros cin3ticos de crecimiento de *F. culmorum* en los medios GYE y con adici3n de DEHF. El mayor valor para la  $\mu$  se mostr3 en el medio que contiene 500 mg/l de DEHF, los valores menores se mostraron en los medios de 1000 mg/l de DEHF y GYE (Tabla 3). La mayor  $X_{m\acute{a}x}$  fue observada en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguido por el medio de 500 mg/l de

DEHF y mostrando la menor  $X_{m\acute{a}x}$  en el medio GYE (Tabla 3). El mayor valor del  $Y_{X/S}$  se mostr3 en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, este par3metro al igual que la  $X_{m\acute{a}x}$  es menor conforme disminuye la concentraci3n de DEHF (Tabla 3).

Tabla 3. Par3metros cin3ticos de crecimiento de *F. culmorum* crecido en fermentaci3n l3quida conteniendo DEHF.

Par3metro	Medio de cultivo		
	GYE	DEHF (mg/l)	
		500	1000
$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	3.4 <sup>c</sup> (0.10)	4.9 <sup>a</sup> (0.10)	5.1 <sup>a</sup> (0.06)
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.05 <sup>b</sup> (0.001)	0.08 <sup>a</sup> (0.026)	0.05 <sup>b</sup> (0.006)
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.34 <sup>d</sup> (0.01)	0.51 <sup>a</sup> (0.01)	0.49 <sup>b</sup> (0.01)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). N3meros entre par3ntesis corresponden a la desviaci3n est3ndar de tres r3plicas en el experimento.

### 7.2.2. Par3metros cin3ticos de crecimiento de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

En la siguiente tabla se muestra los parámetros cinéticos de crecimiento de *F. culmorum* en los medios GYE y con adición de DBF. El mayor valor para la  $\mu$  se mostró en el medio que contiene 500 mg/l de DBF, los valores menores se mostraron en los medios de 1000 mg/l de DBF y GYE (Tabla 4). La mayor  $X_{m\acute{a}x}$  fue observada en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, seguido por el medio de 500 mg/l de DBF y mostrando la menor  $X_{m\acute{a}x}$  en el medio GYE (Tabla 4). El mayor valor del  $Y_{X/S}$  se mostró en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, este parámetro al igual que la  $X_{m\acute{a}x}$  es menor conforme disminuye la concentración de DBF (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de *F. culmorum* crecido en fermentación líquida conteniendo DBF.

Parámetro	Medio de cultivo		
	GYE	DBF (mg/l)	
		500	1000
$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	3.4 <sup>c</sup> (0.10)	4.3 <sup>b</sup> (0.06)	5.0 <sup>a</sup> (0.21)
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.05 <sup>c</sup> (0.001)	0.08 <sup>b</sup> (0.006)	0.10 <sup>a</sup> (0.006)
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.34 <sup>c</sup> (0.01)	0.43 <sup>b</sup> (0.01)	0.49 <sup>a</sup> (0.02)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

### 7.3. pH de *P. ostreatus* y *F. culmorum*

#### 7.3.1. pH de los sobrenadantes de los cultivos de *P. ostreatus* crecido en DEHF

Con respecto al pH, para esta cepa en el medio de 1000 mg/l de DEHF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 5.6 (600 h de fermentación). Para el medio de 500 mg/l de DEHF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 5.8 a las 552 h de la fermentación. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 6.7 (Fig. 10).

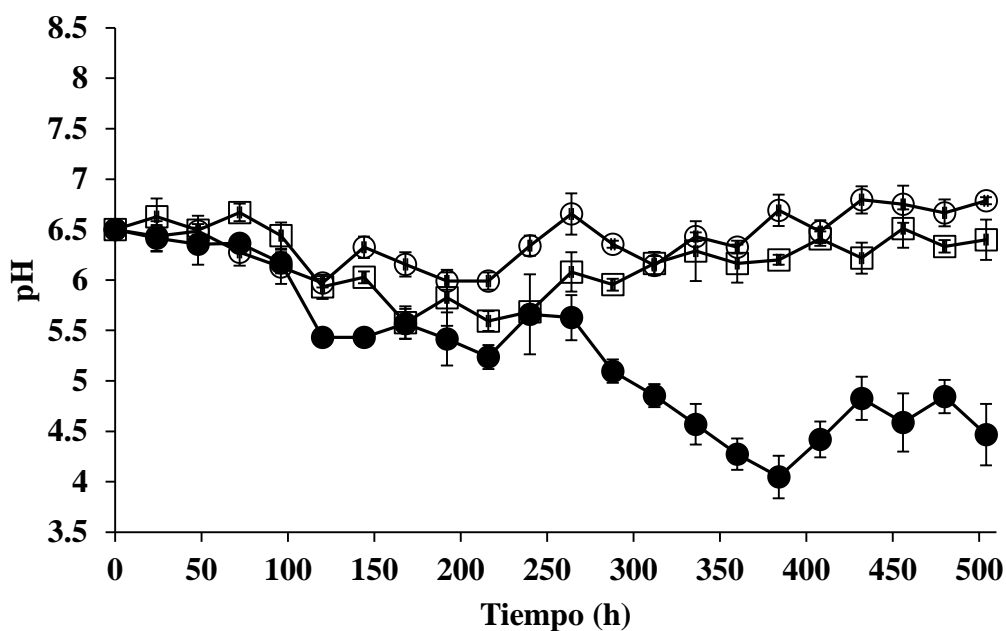


Fig. 10. pH de la cepa *P. ostreatus* crecido en GYE (○), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.

### 7.3.2. pH de los sobrenadantes de los cultivos de *P. ostreatus* crecido en DBF

Con respecto al pH, para esta cepa en el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 6.7. Para el medio conteniendo 1000 mg/l DBF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH a las 360 h de crecimiento fue de 4.3. Para el medio de 500 mg/l de DEHF, el pH inicial fue de 6.5 y el a las 360 h de crecimiento fue de 4.1 (Fig. 11).

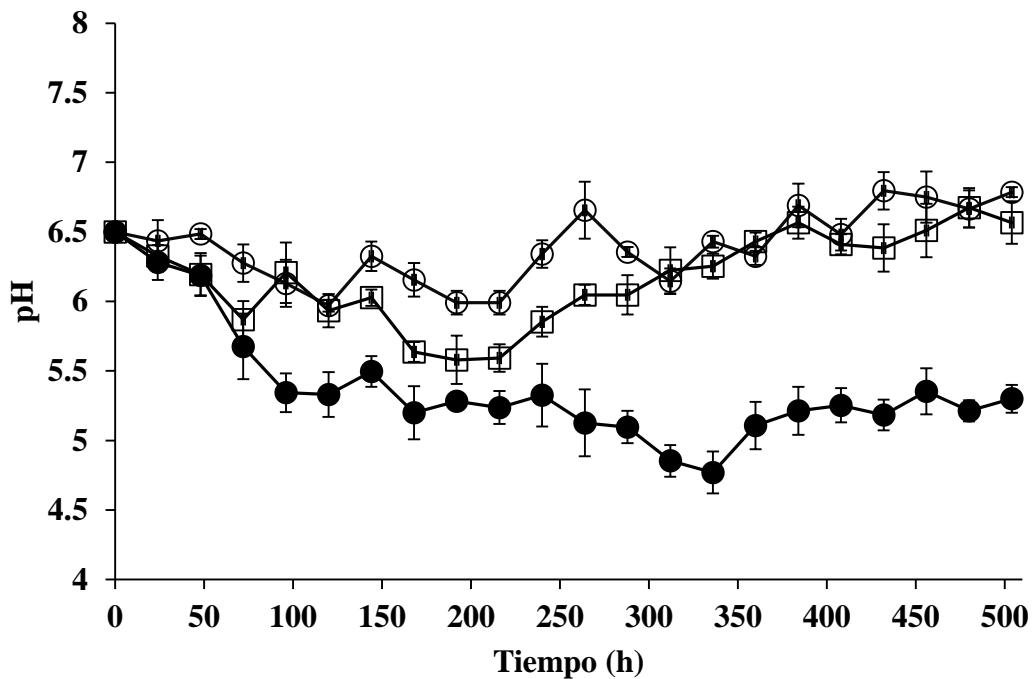


Fig. 11. pH de la cepa *P. ostreatus* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

### 7.3.3. pH de los sobrenadantes de los cultivos de *F. culmorum* conteniendo DEHF

Con respecto al pH, para esta cepa en el medio de 1000 mg/l de DEHF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 8.5 a las 168 h de fermentación. Para el medio de 500 mg/l de DEHF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 7.8 a las 168 h de fermentación. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 7.8 a las 158 h de la fermentación (Fig. 12).

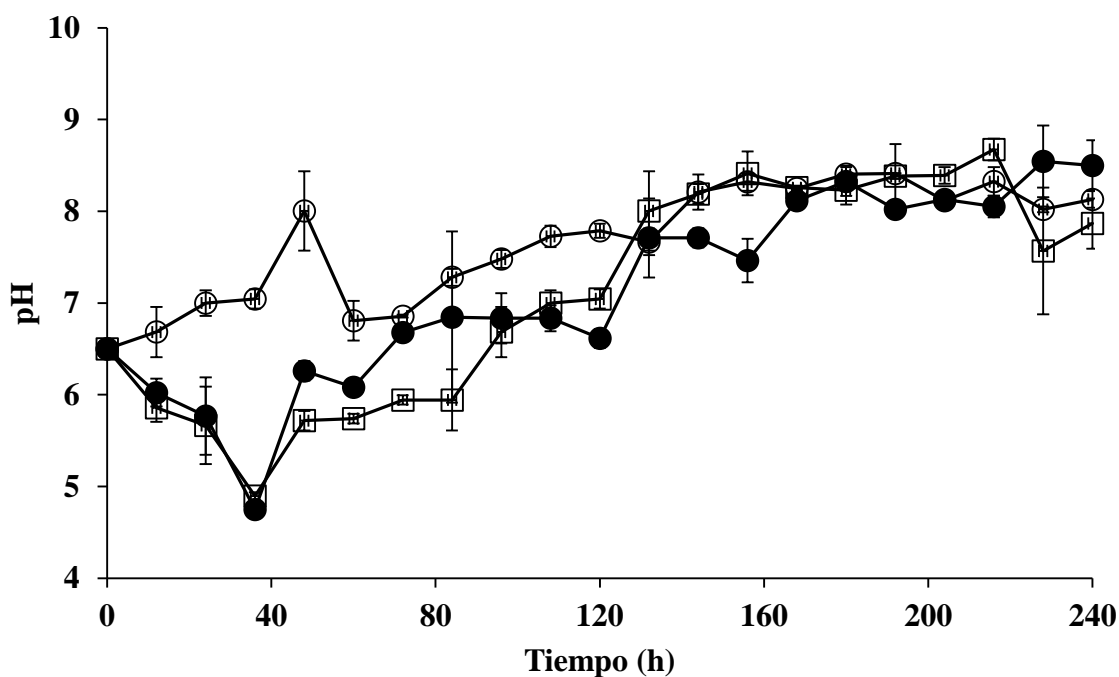


Fig. 12. pH de la cepa *F. culmorum* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.

#### 7.3.4. pH de los sobrenadantes de los cultivos de *F. culmorum* conteniendo DBF



Con respecto al pH, para esta cepa en el medio de 1000 mg/l de DBF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 8.4 a las 168 h de fermentación. Para el medio de 500 mg/l de DBF, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 8.4 a las 168 h de fermentación. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 8.4 a las 158 h de la fermentación (Fig. 13).

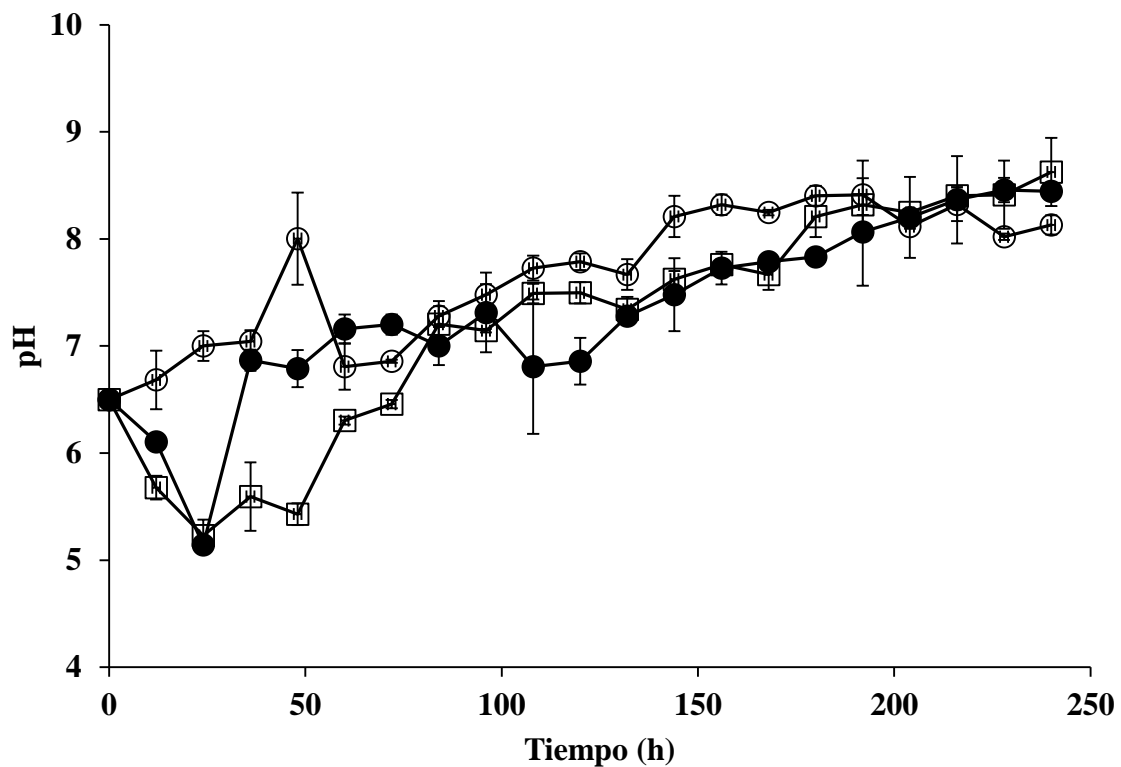


Fig. 13. pH de la cepa *F. culmorum* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

## **7.4. Actividad enzimática de lacasas**

### **7.4.1. Actividad enzimática específica de lacasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DEHF**

En la Figura 14 se muestra la actividad enzimática de lacasas producida por *P. ostreatus* crecido en medio GYE y con la adición de DEHF. La mayor producción de enzimas se observa durante las primeras 160 h de incubación, y se mantiene sin disminuir como en las primeras horas. La mayor actividad de lacasas se presentó en el medio que contenía 1000 mg/l de DEHF, seguido por el medio de 500 mg/l de DEHF, estos valores correspondieron a 11,508.7 U/l a las 336 h de crecimiento y 9,696.6 U/l a las 432 h de incubación, respectivamente. La menor actividad específica se presentó en el medio GYE obteniendo un valor de 7,325 U/l a las 24 h de crecimiento.

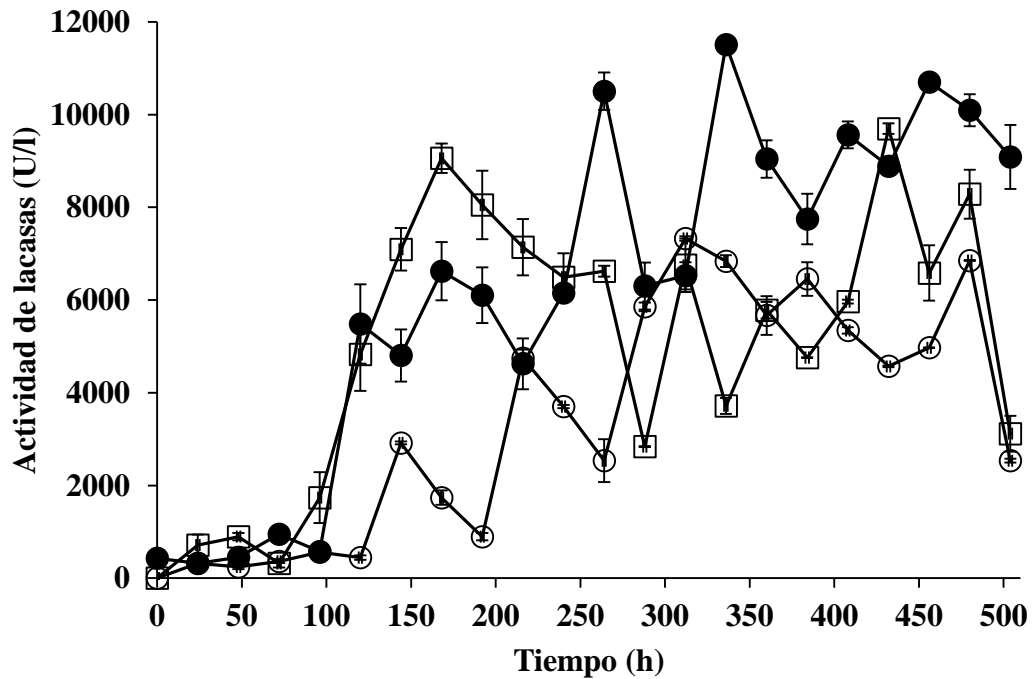


Fig. 14. Actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.

#### 7.4.2. Actividad enzimática específica de lacasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DBF

La actividad enzimática de lacasas producida por *P. ostreatus* crecido en medio GYE y con la adición de DBF se muestra en la Figura 15. La mayor producción de enzimas se observa durante las primeras 120 h de incubación en los medios con adición de ftalato, mostrando que se mantiene sin disminuir conforme transcurre la fermentación. La mayor actividad de lacasas se presentó en el medio que contiene 1000 mg/l de

DBF, seguido por el medio de 500 mg/l de DBF, estos valores correspondieron a 10,094,6 U/l a las 384 h de crecimiento y 8,522.6 U/l a las 288 h de incubación, respectivamente. La mayor actividad de lacasas producida en el medio GYE fue de 7,325 U/l a las 312 h de crecimiento.

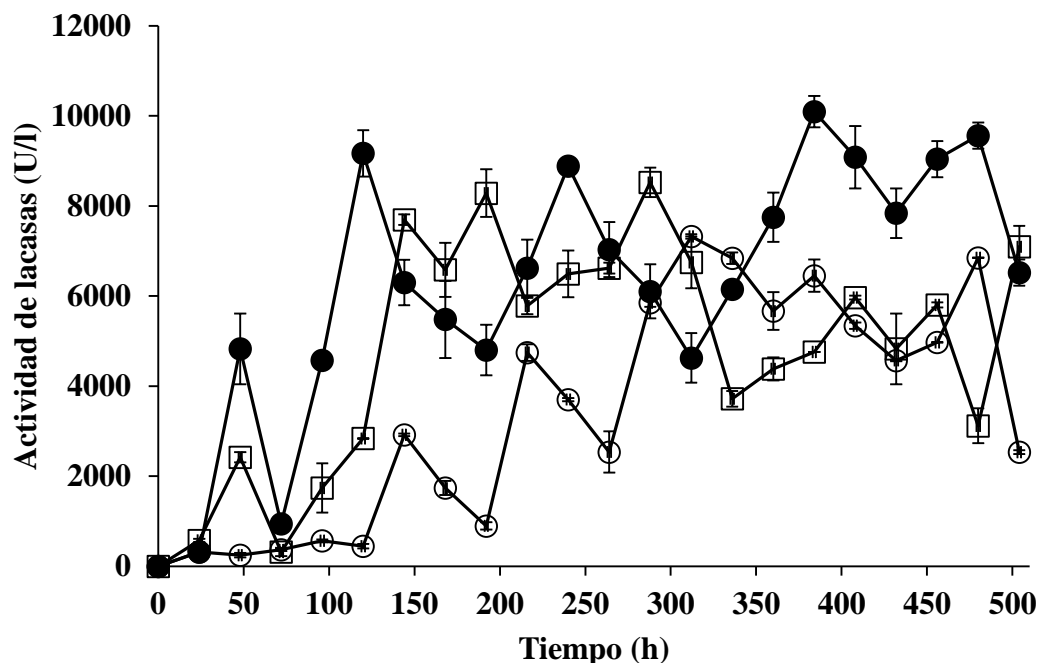


Fig. 15. Actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

#### 7.4.3. Actividad enzimática de lacasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

En la Figura 16 se presenta la actividad enzimática de lacasas producida por *F. culmorum* crecido en medio GYE y medios adicionados con DEHF. *F. culmorum*

mostró la mayor actividad específica de lacasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF durante las primeras 96 h de crecimiento, seguido del medio que contenía 500 mg/l de DEHF a las 228 h de fermentación obteniendo valores de 2,345.4 U/l y 1,705.1 U/l, respectivamente. En el medio GYE que mostró la mayor actividad de lacasas a las 204 h de fermentación obteniendo un valor de 1,272.9 U/l.

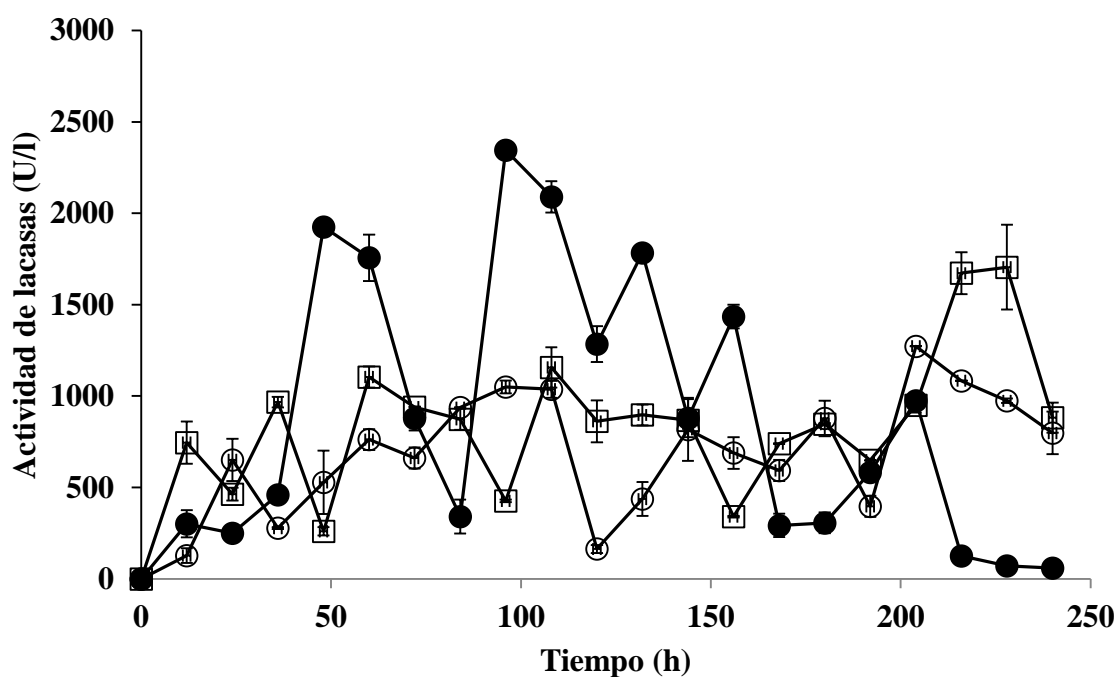


Fig. 16. Actividad enzimática de lacasas de *F. culmorum* crecido en GYE (○), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.

#### 7.4.4. Actividad enzimática de lacasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

En la Figura 17 se presenta la actividad enzimática de lacasas producida por *F. culmorum* crecido en medio GYE y medios adicionados con DBF. *F. culmorum* mostró la mayor actividad de lacasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF durante las 204 h de fermentación obteniendo un valor de 2,588.6 U/l. En el medio de 500 mg/l de DBF la mayor producción de esta enzima se mostró durante las 120 h de incubación, obteniendo un valor de 1,702.2 U/l. En el medio GYE la mayor producción de lacasas fue durante las últimas horas de la fermentación, mostrando un valor de 1,234.9 U/l.

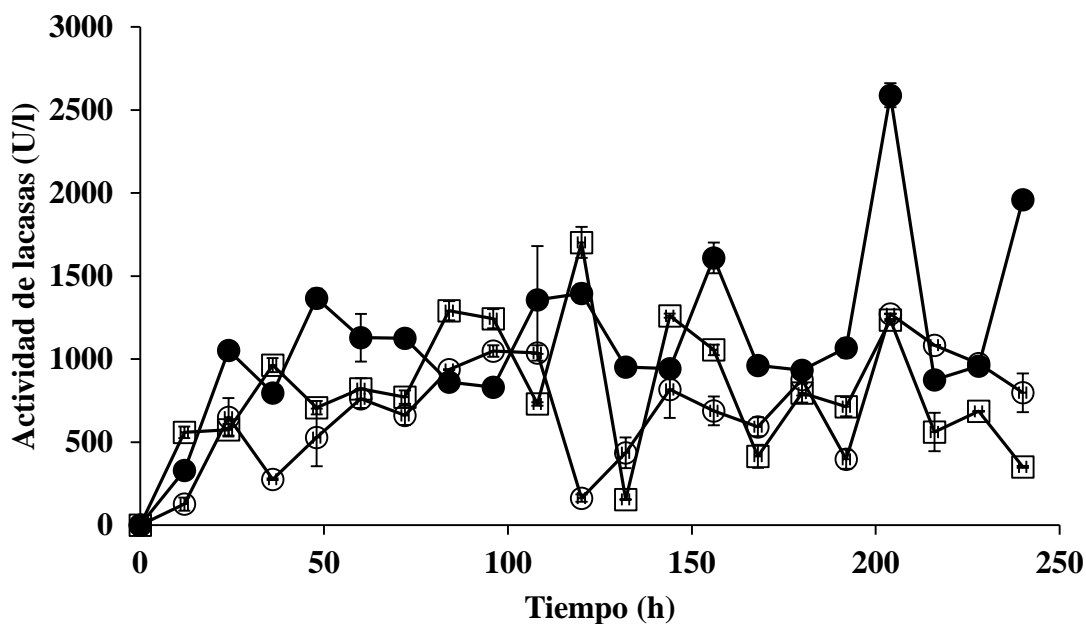


Fig. 17. Actividad enzimática de lacasas de *F. culmorum* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

## 7.5. Parámetros cinéticos de producción de lacasas

### 7.5.1. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DEHF

*P. ostreatus* presentó la mayor  $E_{\text{máx}}$  y el mayor  $Y_{EX}$  en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF y conforme disminuye la concentración disminuyen ambos parámetros de esta enzima. Con respecto a la  $P$ , la mayor productividad se presentó en el medio GYE seguido de los medios con adición del DEHF. La mayor  $q_p$  se presentó en el medio 500 mg/l de DEHF seguido por el medio GYE (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas por *P. ostreatus* crecido en fermentación líquida conteniendo DEHF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DEHF (mg/l)	
		500	1000
$E_{\text{max}}$ (U/l)	7325 <sup>c</sup> (58.7)	9696.6 <sup>b</sup> (181.1)	11508.7 <sup>a</sup> (113.9)
$Y_{EX}$ (U/gX)	1411.3 <sup>b</sup> (39.6.2)	1484.9 <sup>a</sup> (52.6)	1496.5 <sup>a</sup> (52.9)
$P$ (U/gX/h)	34.3 <sup>a</sup> (0.76)	22.4 <sup>b</sup> (1.4)	23.5 <sup>b</sup> (1.1)
$q_p$ (U/gX/h)	29.63 <sup>b</sup> (2.3)	32.66 <sup>a</sup> (3.12)	26.93 <sup>c</sup> (2.04)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

### 7.5.2. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DBF

En la Tabla 6 se presentan los parámetros cinéticos de producción de lacasas por *P. ostreatus* crecido en medios adicionados con DBF y en el medio GYE. *P. ostreatus* presentó la mayor  $E_{m\acute{a}x}$  y en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, se puede observar que conforme disminuye la concentración, disminuyen este parámetro. El valor más alto para el  $Y_{EX}$  se obtuvo en el medio GYE, seguido por el medio de 500 mg/l de DBF y 1000 mg/l de DBF. Con respecto a la  $P$ , la mayor productividad se presentó en el medio 500 mg/l de DBF seguido de los medios 1000 mg/l de DBF y el medio GYE, con adición del DEHF. La mayor  $q_p$  se presentó en el medio 500 mg/l de DBF seguido por el medio 1000 mg/DBF.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas por *P. ostreatus* crecido en fermentación líquida conteniendo DBF

Parámetros	Medios de cultivo		
	GYE	DBF (mg/l)	
		500	1000
$E_{max}$ (U/l)	1832 <sup>c</sup> (58.7)	8522.6 <sup>b</sup> (125.7)	10094.6 <sup>a</sup> (98.9)
$Y_{EX}$ (U/gX)	1411.36 <sup>a</sup> (42.51)	1340.03 <sup>b</sup> (79.71)	1379.04 <sup>c</sup> (79.69)
$P$ (U/gX/h)	5.87 <sup>c</sup> (0.9)	29.59 <sup>a</sup> (0.63)	26.28 <sup>b</sup> (2.1)
$q_p$ (U/gX/h)	7.41 <sup>c</sup> (0.05)	29.59 <sup>a</sup> (0.87)	14 <sup>b</sup> (0.3)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.



### 7.5.3. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

En la siguiente Tabla 7 se presentan los parámetros cinéticos de producción de lacasas por el hongo *F. culmorum* crecido en medios GYE y 500 y 1000 mg/l de DEHF/l. La mayor  $E_{max}$  se presentó en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguido por el medio 500 mg/l de DEHF y obteniendo el valor más bajo en el medio GYE. El valor más alto para el  $Y_{EX}$  se obtuvo en el medio 1000 mg/l de DEHF, seguido por el medio GYE y el medio de 500 mg/l de DEHF. Con respecto a la  $P$  y a la  $q_p$  el valor más alto se mostró en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, sin embargo para la  $P$  el valor menor se mostró en el medio de GYE y la menor  $q_p$  se presentó en el medio 500 mg/l de DEHF.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DEHF (mg/l)	
		500	1000
$E_{max}$ (U/l)	1272.9 <sup>c</sup> (0.8)	1739.1 <sup>b</sup> (172.9)	2345.4 <sup>a</sup> (28.7)
$Y_{EX}$ (U/gX)	374.4 <sup>b</sup> (11.1)	355.4 <sup>c</sup> (41.4)	456.9 <sup>a</sup> (9.3)
$P$ (U/gX/h)	6.2 <sup>c</sup> (0.0)	7.7 <sup>b</sup> (0.5)	24.4 <sup>a</sup> (0.3)
$q_p$ (U/gX/h)	19.8 <sup>b</sup> (0.5)	16.5 <sup>c</sup> (2.3)	36.4 <sup>a</sup> (11.7)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

#### 7.5.4. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

En la siguiente Tabla 8 se presentan los parámetros cinéticos de producción de lacasas por el hongo *F. culmorum* crecido en medios GYE y 500 y 1000 mg/l de DBF. Con respecto a la  $E_{\max}$ ,  $Y_{EX}$  y la  $q_p$ , los valores más altos de estos parámetros se mostraron en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF, seguido por el medio 500 mg/l de DBF y obteniendo los valores más bajos en el medio GYE. La  $P$  más alta se mostró en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF, seguido por el medio 1000 mg/l de DBF y GYE.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DEHF (mg/l)	
		500	1000
$E_{\max}$ (U/l)	1234.9 <sup>c</sup> (0.8)	1702.2 <sup>b</sup> (93.5)	2588.6 <sup>a</sup> (58.5)
$Y_{EX}$ (U/gX)	374.4 <sup>c</sup> (11.1)	399.1 <sup>b</sup> (25)	532 <sup>a</sup> (16.4)
$P$ (U/gX/h)	6.2 <sup>c</sup> (0.0)	14.2 <sup>a</sup> (0.8)	12.8 <sup>b</sup> (0.3)
$q_p$ (U/gX/h)	19.8 <sup>c</sup> (0.5)	33.3 <sup>b</sup> (3.5)	51.5 <sup>a</sup> (4.4)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

## 7.6. Actividad enzimática específica de esterasas

### 7.6.1. Actividad enzimática específica de esterasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DEHF

En la Figura 18 se presenta la actividad enzimática de esterasas producida por *P. ostreatus* crecido en medio GYE y medios adicionados con DEHF. *P. ostreatus* mostró la mayor actividad de lacasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguido por el medio de 500 mg/l de DEHF a las 72 h y 168 h de fermentación, respectivamente, obteniendo valores de 3,748.3 U/l y 3,147 U/l, respectivamente. En el medio GYE se mostró la mayor actividad de esterasas a las 312 h de fermentación obteniendo un valor de 1,832 U/l.

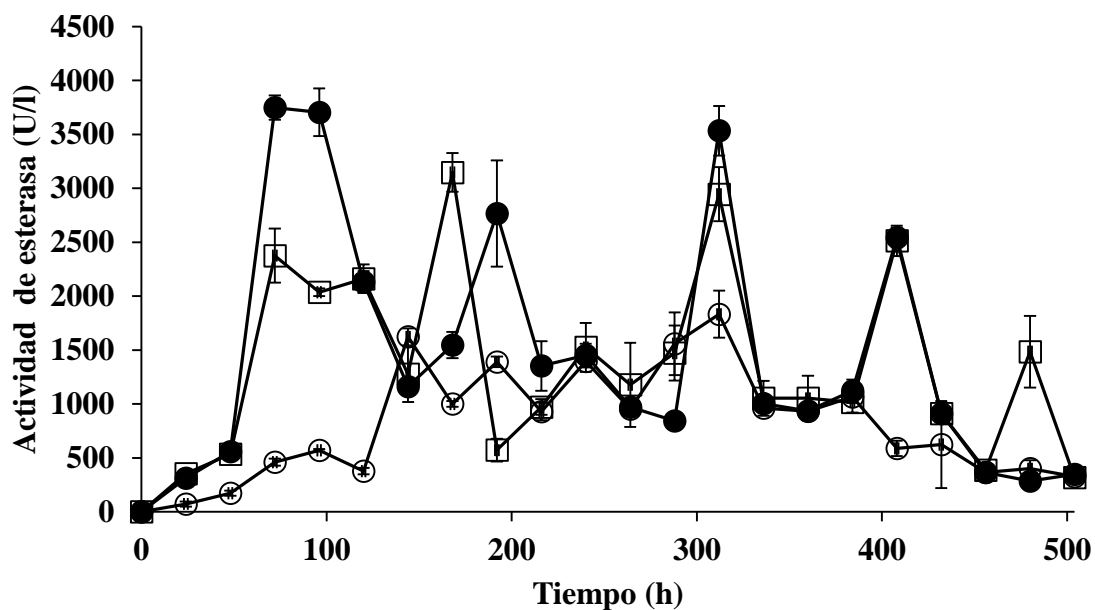


Fig. 18. Actividad enzimática de esterasas de *P. ostreatus* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

### 7.6.2. Actividad enzimática de esterasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DBF

En la siguiente Figura 19 se muestra la actividad de esterasas producida por *P. ostreatus* crecido en el medio GYE y los medio adicionados con DBF. *P. ostreatus* mostró la mayor producción de enzimas esterasas en el medio 1000 mg/l de DBF, obteniendo una actividad mayor de 3,704.6 U/l a las 96 h de fermentación, seguido de la producción en el medio de 500 mg/l de DEHF con un valor de 3,147 U/l a las 168 h de crecimiento. En el medio GYE se mostró la mayor actividad de esterasas a las 312 h de fermentación DBF obteniendo un valor de 1,832 U/l.

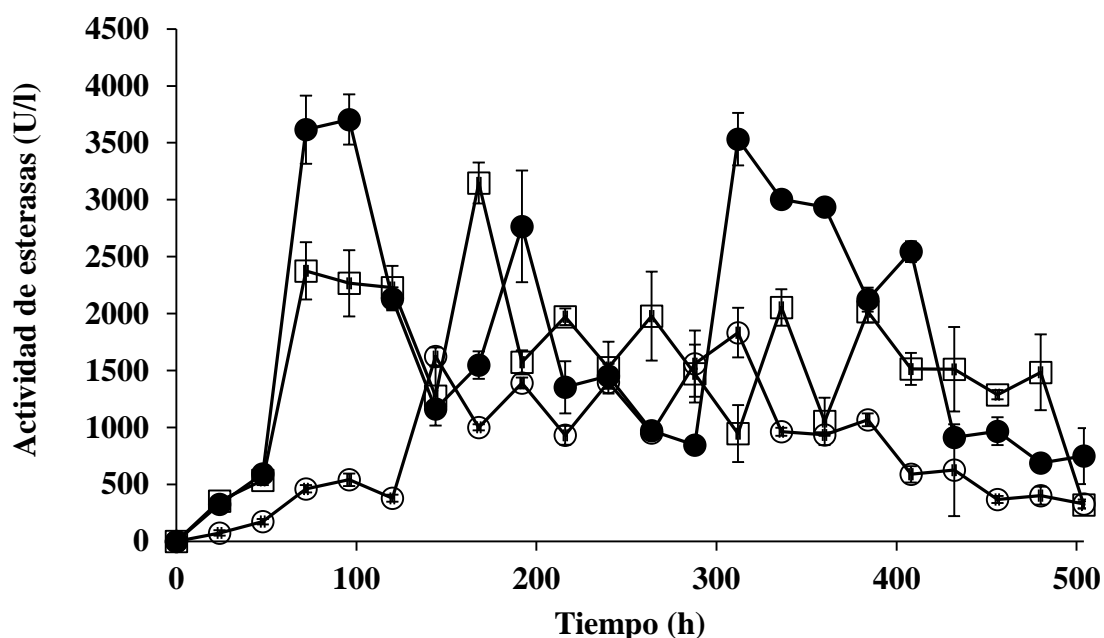


Fig. 19. Actividad enzimática de esterasas de *P. ostreatus* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

### 7.6.3. Actividad enzimática de esterasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

En la Figura 20 se presenta la actividad enzimática de esterasas producida por *F. culmorum* crecido en medio GYE, 500 mg/l de DEHF y 1000 mg/l de DEHF. *F. culmorum* mostró la mayor actividad de esterasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF entre las 84 y 120 h de crecimiento obteniendo un valor de 12,645 U/l. Respecto al medio de 500 mg/l de DEHF la producción de esta enzima fue mayor a las 72 h de fermentación obteniendo un valor de 6,772.6 U/l. En el medio GYE se presentó la menor actividad específica de esterasas producida por este hongo.

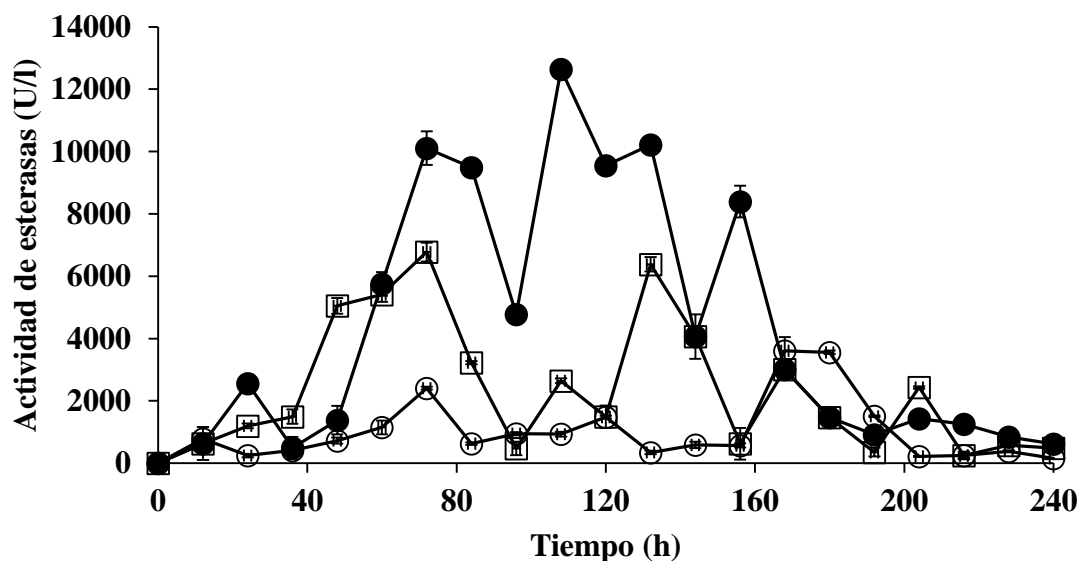


Fig. 20. Actividad enzimática de esterasas de *F. culmorum* crecido en GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DEHF en fermentación líquida.

#### 7.6.4. Actividad enzimática de esterasa de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

En la Figura 21 se presenta la actividad enzimática de esterasas producida por *F. culmorum* crecido en medio GYE y en los medios adicionados con DBF. *F. culmorum* mostró la mayor actividad de esterasas en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF durante las 168 h de fermentación obteniendo un valor de 8,473.6 U/l. En el medio de 1000 mg/l de DBF la producción de esta enzima se produjo a las 204 h de incubación, mostrando una producción de 7950 U/l. En el medio GYE se presentó la menor actividad específica de esterasas producida por este microorganismo.

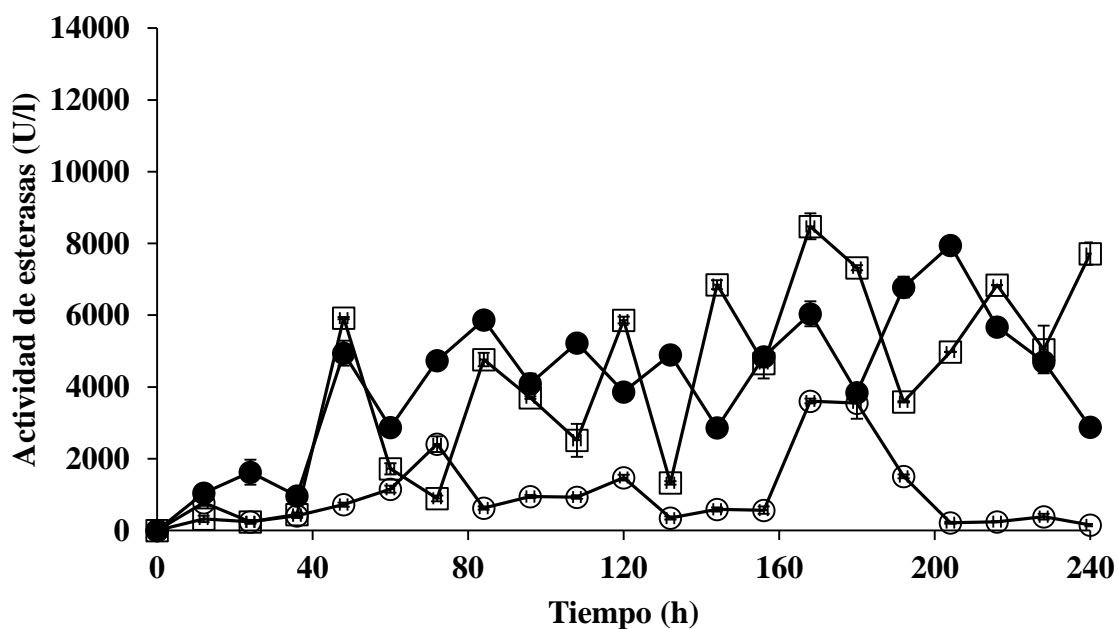


Fig. 21. Actividad enzimática de esterasas de *F. culmorum* crecido GYE (o), 500 (□) y 1000 (●) mg/l de DBF en fermentación líquida.

## 7.7. Parámetros cinéticos de producción de esterasas

### 7.7.1. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DEHF

En la Tabla 9 se muestran los parámetros cinéticos de producción de esterasas producidas por *F. culmorum* en los medios GYE y 500 y 1000 mg/l de DEHF. La mayor producción de  $E_{max}$ ,  $Y_{EX}$ ,  $q_p$  y  $P$  se presentaron en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguidos en el caso de la  $E_{max}$  y la  $P$  en el medio de 500 mg/l de DEHF, y para el  $Y_{EX}$  y la  $q_p$  en el medio GYE. En todos los parámetros cinéticos el valor menor de producido en el medio GYE.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DEHF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DEHF (mg/l)	
		500	1000
$E_{max}$ (U/l)	1832 <sup>c</sup> (104.4)	3472.4 <sup>b</sup> (98.9)	4765.6 <sup>a</sup> (102.1)
$Y_{EX}$ (U/gX)	352.98 <sup>b</sup> (54.2)	531.76 <sup>c</sup> (31.9)	619.71 <sup>a</sup> (12.8)
$P$ (U/gX/h)	5.87 <sup>c</sup> (0.4)	12.05 <sup>b</sup> (3.3)	24.82 <sup>a</sup> (2.0)
$q_p$ (U/gX/h)	7.41 <sup>b</sup> (0.05)	11.69 <sup>a</sup> (0.067)	11.15 <sup>a</sup> (0.08)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

### 7.7.2. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DBF

*F. culmorum* mostró a mayor  $E_{max}$ ,  $Y_{EX}$  y  $P$  en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF seguido del medio de 500 mg/l de DBF y el valor más pequeño para estos parámetros se presentó en el medio GYE (Tabla 10). En el caso de la  $q_p$  el valor mayor se presentó en el medio de 500 mg/l de DBF, seguido del medio de 1000 mg/l de DBF y del medio GYE, siendo el medio donde se mostró el valor de  $q_p$  menor.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *P. ostreatus* crecido en los medios que contienen DBF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DBF (mg/l)	
		500	1000
$E_{max}$ (U/l)	1832 <sup>c</sup> (104.4)	3147.09 <sup>b</sup> (102.5)	3704.66 <sup>a</sup> (86.4)
$Y_{EX}$ (U/gX)	352.98 <sup>c</sup> (54.2)	494.8 <sup>b</sup> (31.9)	514.5 <sup>a</sup> (10.5)
$P$ (U/gX/h)	5.87 <sup>c</sup> (0.4)	18.73 <sup>b</sup> (0.51)	38.59 <sup>a</sup> (0.9)
$q_p$ (U/gX/h)	7.54 <sup>c</sup> (0.05)	29.48 <sup>a</sup> (1.01)	7.71 <sup>b</sup> (0.09)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.



### 7.7.3. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

En la Tabla 11 se muestran los parámetros cinéticos de producción de enzimas esterasas producidas por *F. culmorum* crecido en los medios GYE, 500 mg/l de DEHF y 1000 mg/l de DEHF. *F. culmorum* mostró la mayor la mayor producción de  $E_{max}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $q_p$  y  $P$  en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguidos en el medio de 500 mg/l de DEHF. La menor producción de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $q_p$  y  $P$  se observó en el medio GYE.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DEHF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DEHF (mg/l)	
		500	1000
$E_{max}$ (U/l)	3754.3 <sup>c</sup> (205.4)	6772.7 <sup>b</sup> (238.9)	12645.0 <sup>a</sup> (216.8)
$Y_{E/X}$ (U/gX)	1106.0 <sup>c</sup> (92.5)	1319.2 <sup>b</sup> (35.1)	2582.0 <sup>a</sup> (96.0)
$P$ (U/gX/h)	21.8 <sup>c</sup> (0.4)	94.1 <sup>b</sup> (3.3)	117.1 <sup>a</sup> (2.0)
$q_p$ (U/gX/h)	58.6 <sup>c</sup> (4.2)	61.5 <sup>b</sup> (7.4)	207.7 <sup>a</sup> (72.1)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

#### 7.7.4. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

En la Tabla 12 se muestran los parámetros cinéticos de producción de enzimas esterasas producidas por *F. culmorum* crecido en los medios GYE, 500 mg/l de DEHF y 1000 mg/l de DEHF (Tabla 12). *F. culmorum* mostró la mayor la mayor producción de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $q_p$  y  $P$  en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF, seguidos en el medio de 500 mg/l de DEHF. La menor producción de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $q_p$  y  $P$  se observó en el medio GYE (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros cinéticos de producción de esterasas de *F. culmorum* crecido en los medios que contienen DBF

Parámetros	Medio de cultivo		
	GYE	DBF (mg/l)	
		500	1000
$E_{max}$ (U/l)	3754.3 <sup>c</sup> (205.4)	7950.6 <sup>b</sup> (40.3)	8498.0 <sup>a</sup> (258.7)
$Y_{E/X}$ (U/gX)	1106.0 <sup>c</sup> (92.5)	1581.6 <sup>b</sup> (74.6)	1977.1 <sup>a</sup> (106.8)
$P$ (U/gX/h)	21.8 <sup>c</sup> (0.1)	390 (0.03)	50.6 <sup>a</sup> (0.002)
$q_p$ (U/gX/h)	58.6 <sup>c</sup> (4.2)	153.0 <sup>b</sup> (13.4)	164.8 <sup>a</sup> (14.9)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

## 7.8. Biodegradación y eficiencia de remoción de DEHF

### 7.8.1. Biodegradación y eficiencia de remoción de DEHF por *P. ostreatus*

La Figura 22 muestra el porcentaje de biodegradación de DEHF durante el cultivo y la concentración de DEHF (transformación log) graficada contra el tiempo. Esta gráfica fue usada para determinar la constante de biodegradación de primer orden de DEHF. *P. ostreatus* fue capaz de degradar un 93.83% de la concentración inicial (1000 mg/l) después de las 336 h de incubación. En el caso del medio de cultivo conteniendo 500 mg/l de DEHF, se degradó el 94.65% después de las 336 h de incubación (Fig. 22a). La constante de biodegradación ( $k$ ) fue de  $0.0081 \text{ h}^{-1}$  y  $0.0083 \text{ h}^{-1}$  para 1000 y 500 mg/l de DEHF, respectivamente (Fig. 22b). La  $k$  fue similar en ambas concentraciones de DEHF, y no se observó inhibición del crecimiento fúngico en ninguna de las dos concentraciones.

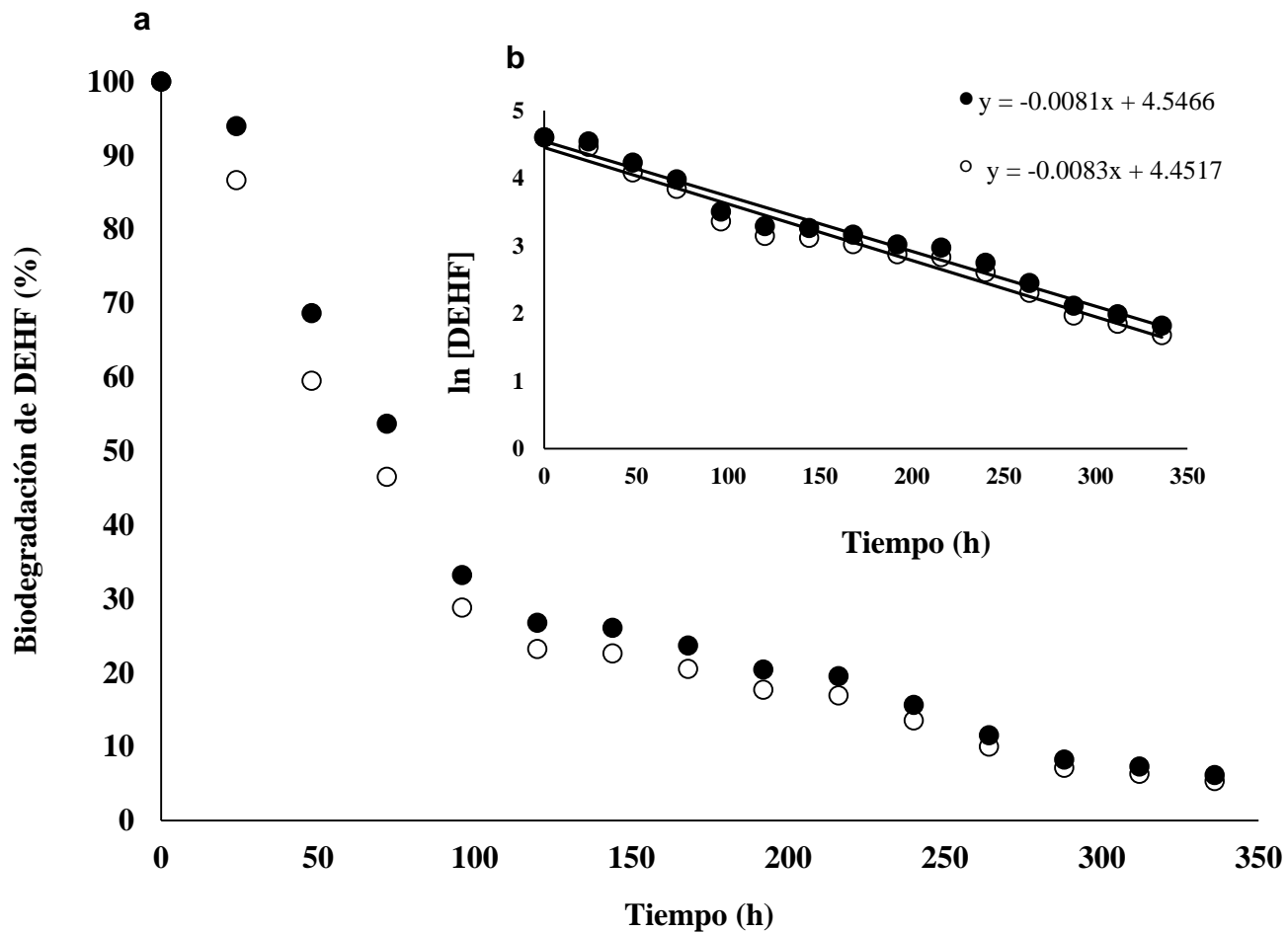


Fig. 22. Porcentaje de biodegradación de DEHF por *F. culmorum* (a) y concentración de DEHF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar  $k$  (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (•) mg/l de DEHF.

### 7.8.2. Biodegradación y eficiencia de remoción de DEHF por *F. culmorum*

La Figura 23 muestra el porcentaje de biodegradación de DEHF durante el cultivo y la concentración de DEHF (transformación log) graficada contra el tiempo. Esta gráfica fue usada para determinar la constante de biodegradación de primer orden de DEHF. *F. culmorum* fue capaz de degradar un 99% de la concentración inicial (1000 mg/l) después de 144 h de incubación. En el caso del medio de cultivo conteniendo 500 mg/l de DEHF, se degradó el 93% y cerca del 98% del DEHF dentro de las 84 y 144 h de incubación, respectivamente (Fig. 23a). La constante de biodegradación ( $k$ ) fue de  $0.0242 \text{ h}^{-1}$  y  $0.0241 \text{ h}^{-1}$  para 1000 y 500 mg/l de DEHF, respectivamente (Fig. 23b). La  $k$  fue similar en ambas concentraciones de DEHF, y no se observó inhibición del crecimiento fúngico en ninguna de las dos concentraciones.

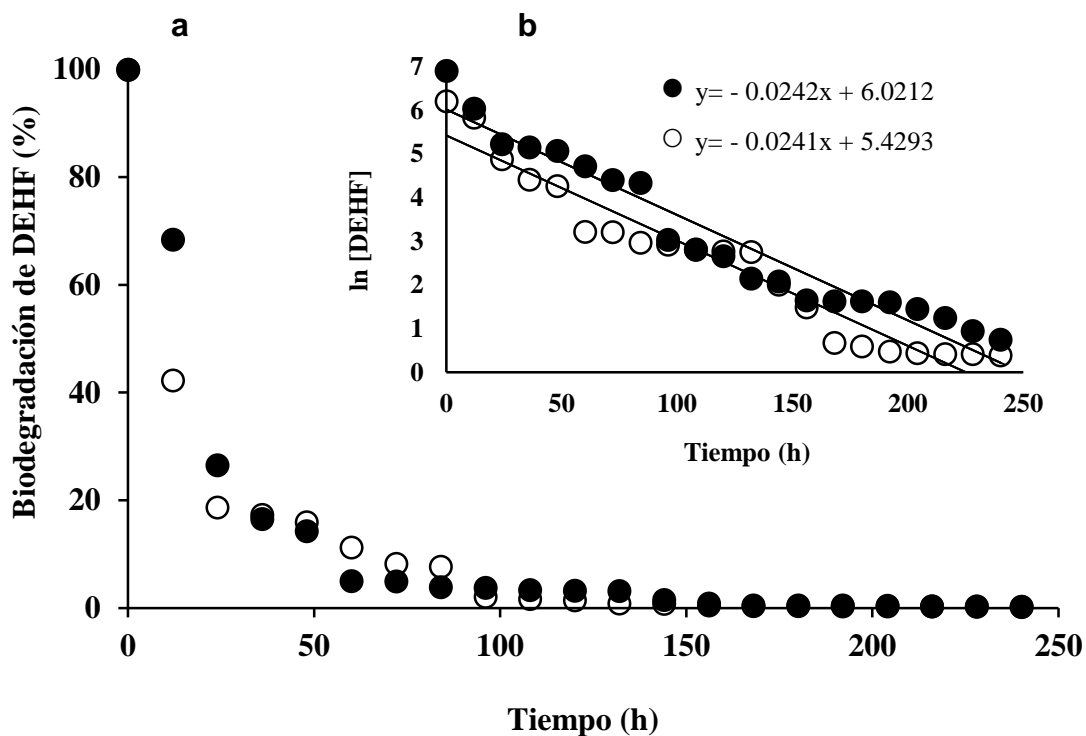


Fig. 23. Porcentaje de biodegradación de DEHF por *F. culmorum* (a) y concentración de DEHF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar  $k$  (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DEHF.

## 7.9. Biodegradación y eficiencia de remoción de DBF

### 7.9.1. Biodegradación y eficiencia de remoción de DBF por *P. ostreatus*

La Figura 24 muestra el porcentaje de biodegradación de DBF durante el cultivo y la concentración de DEHF (transformación log) graficada contra el tiempo. Esta gráfica fue usada para determinar la constante de biodegradación de primer orden de DBF. *P.*

*ostreatus* fue capaz de degradar un 85.2% de la concentración inicial (1000 mg/l) después de las 336 h de incubación. En el caso del medio de cultivo conteniendo 500 mg/l de DBF, se degradó el 99.73% después de las 336 h de incubación (Fig. 24a). La constante de biodegradación ( $k$ ) fue de  $0.0059 \text{ h}^{-1}$  y  $0.0171 \text{ h}^{-1}$  para 1000 y 500 mg/l de DBF, respectivamente (Fig. 24b). La  $k$  fue similar en ambas concentraciones de DEHF, y no se observó inhibición del crecimiento fúngico en ninguna de las dos concentraciones.

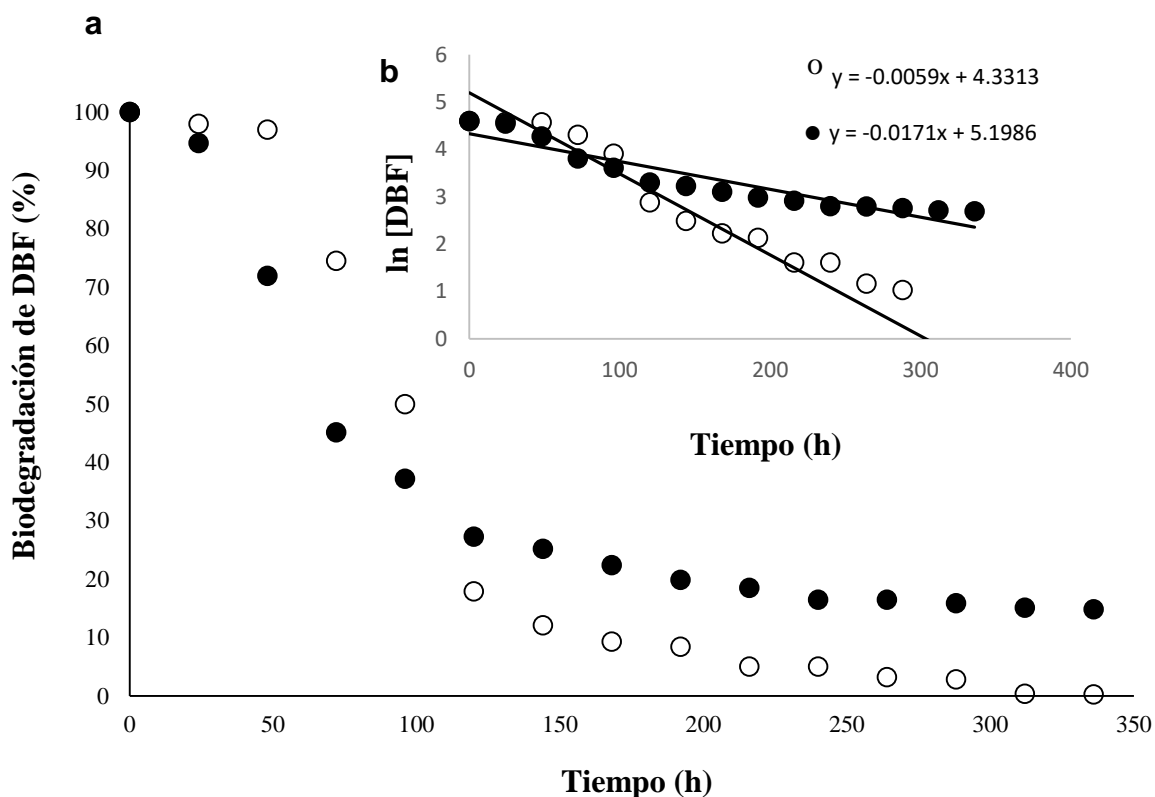


Fig. 24. Porcentaje de biodegradación de DBF por *P.ostreatus* (a) y concentración de DBF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar  $k$  (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DBF.

### 7.9.2. Biodegradación y eficiencia de remoción de DBF por *F. culmorum*

La Figura 25 muestra el porcentaje de biodegradación de DBF durante el cultivo y la concentración de DBF (transformación log) graficada contra el tiempo. Esta gráfica fue usada para determinar la constante de biodegradación de primer orden de DBF. *F. culmorum* fue capaz de degradar un 99% de la concentración inicial (1000 mg/l) después de 180 h de incubación. En el caso del medio de cultivo conteniendo 500 mg/l de DBF, se degradó cerca del 98% del DBF dentro de las 216 h de incubación, respectivamente (Fig. 25a). La constante de biodegradación ( $k$ ) fue de  $0.0231 \text{ h}^{-1}$  y  $0.0164 \text{ h}^{-1}$  para 1000 y 500 mg/l de DBF, respectivamente (Fig. 25b). No se observó inhibición del crecimiento fúngico en ninguna de las dos concentraciones.



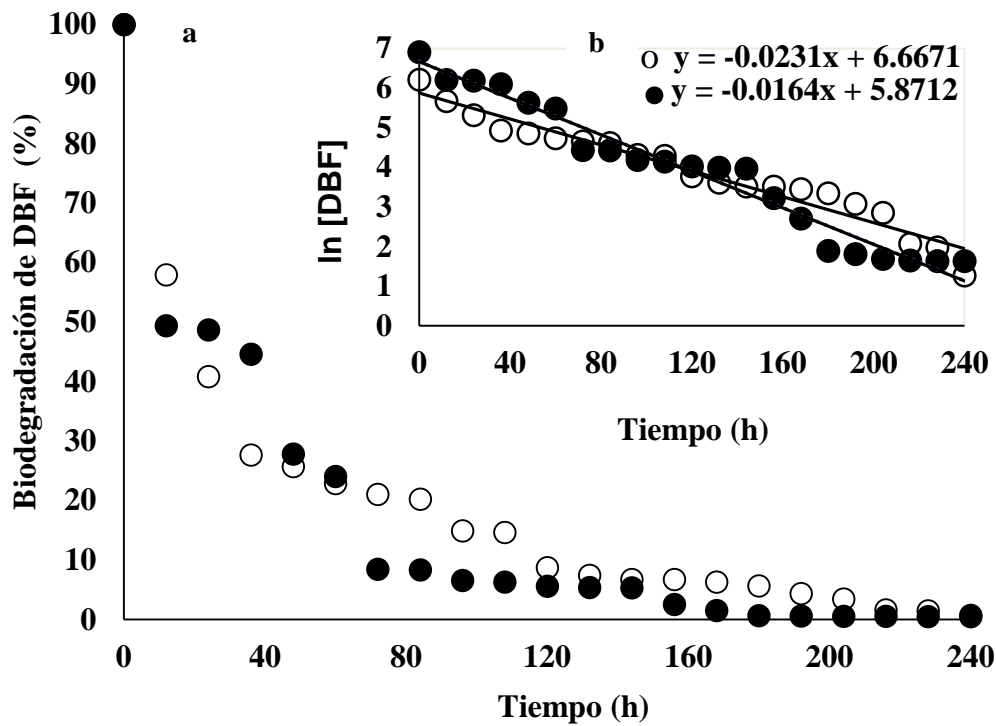


Fig. 25. Porcentaje de biodegradación de DBF por *F. culmorum* (a) y concentración de DBF (transformación log) graficada a través del tiempo usada para determinar  $k$  (b). Medio de cultivo conteniendo 500 (o) y 1000 (●) mg/l de DBF.

## 7.10. Ruta de degradación del DEHF

### 7.10.1. Ruta de degradación de DEHF por *P. ostreatus*

Se propone que la ruta de biodegradación de DEHF procede de la hidrólisis de DEHF con la formación de MEHF, etanol y hexanal. El MEHF es metabolizado probablemente a ácido ftálico por acción de la enzima esterasa en una reacción de desesterificación. Por otro lado, el etanol por una reacción de oxidación es metabolizado a acetaldehído.

Finalmente, el acetaldehído es metabolizado por una reacción de oxidación a ácido acético (Fig. 26).

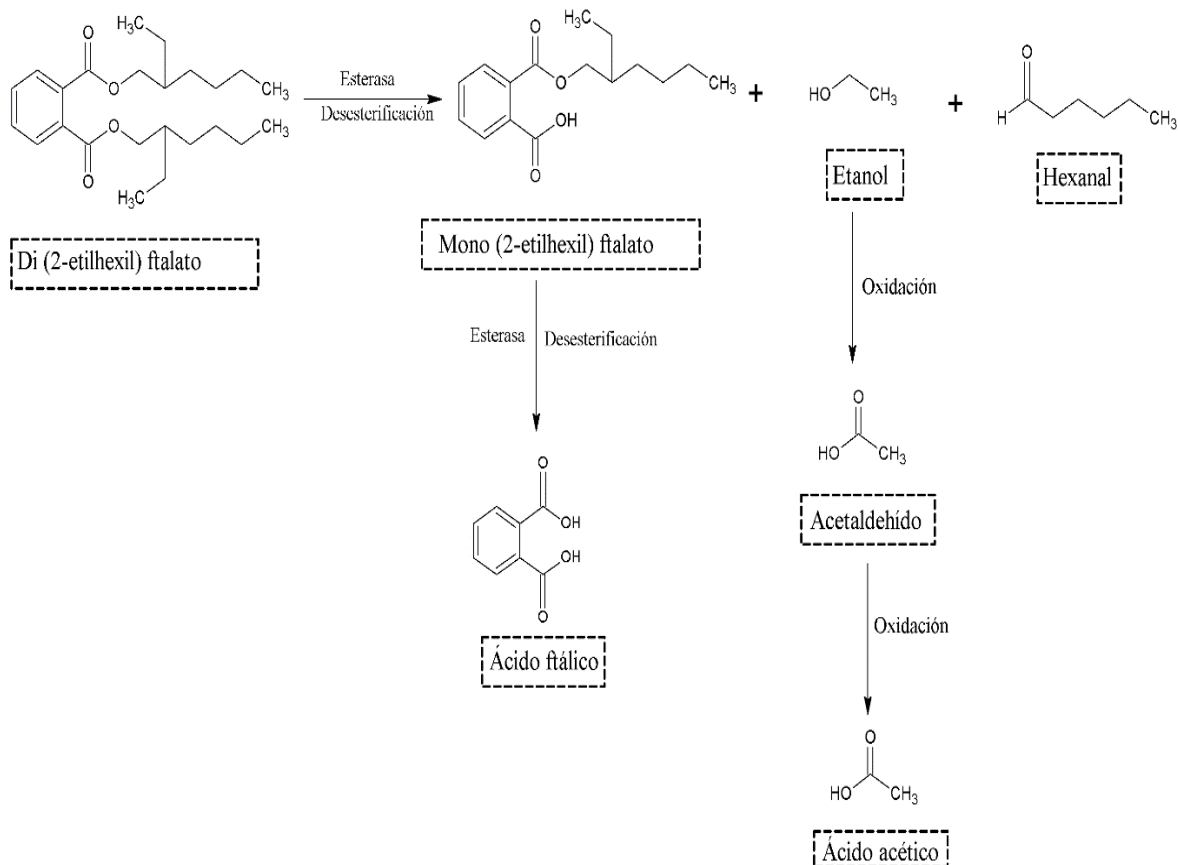


Fig. 26. Ruta de biodegradación propuesta de DEHF por *P. ostreatus*. Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.

### 7.10.2. Ruta de degradación de DEHF por *F. culmorum*

Los compuestos identificados por GC/MS se muestran en recuadros con líneas punteadas, el resto de los compuestos fueron propuestos para elaborar la ruta de biodegradación (Fig. 27). Se propone que la ruta de biodegradación de DEHF procede

de la hidrólisis de DEHF con la formación de MEHF. El MEHF es metabolizado probablemente a ácido 6-etil-4-oxodec-2-enoico (EOEA) a través del rearrreglo de McLafferty en el cual se libera ciclobutadieno después de la escisión del anillo aromático. EOEA es hidrogenado con la formación de ácido 2,3-dihidroxi-butanedioico (DHBA). Se sugiere para este paso la acción combinada de una esterasa y una hidroxilasa. Después, el DHBA se metaboliza a 2,3-dihidroxi-butanedioico (DHB) por la acción de una aldosa reductasa. Posteriormente, el DHB se reduce a 1,2,3,4-butanetetrol (BTT) por la acción de una reductasa. Finalmente, el BTT es metabolizado a 2,3-butanediol (BD) por una reacción de hidrogenación/reducción (Fig. 27).

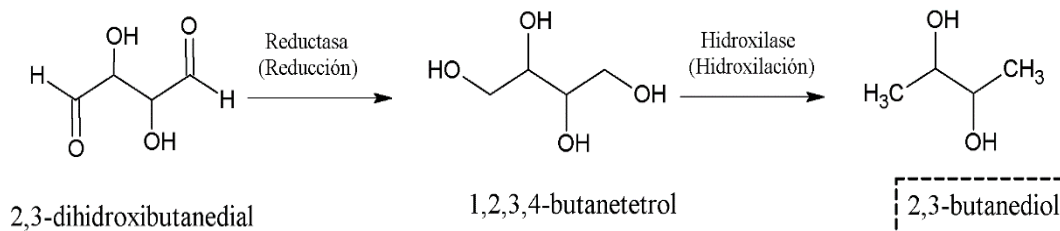
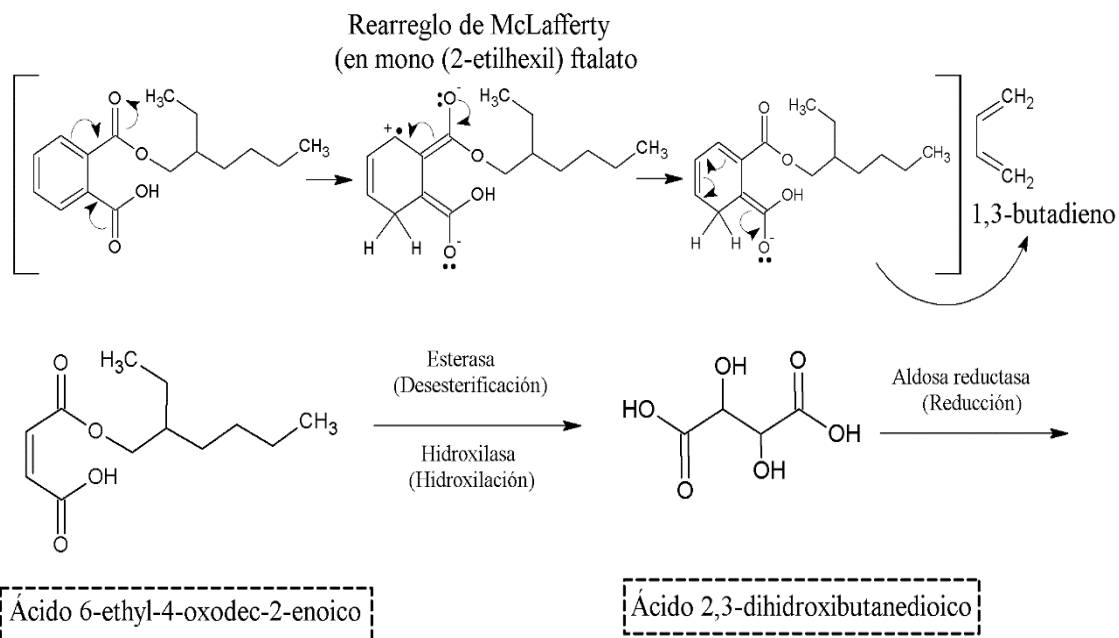
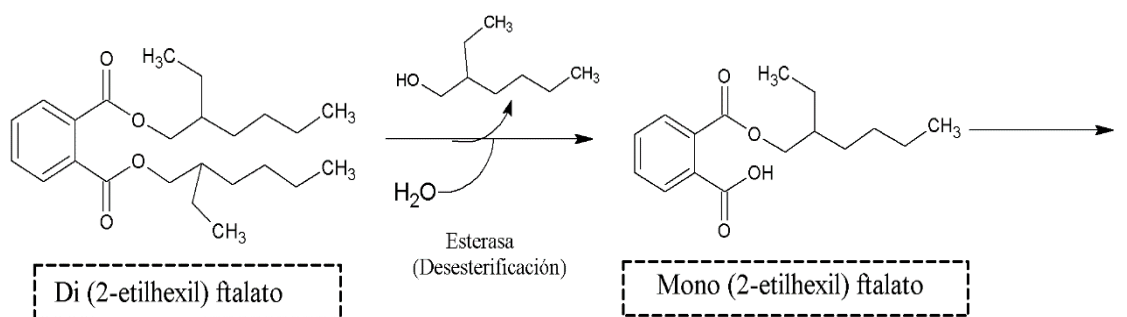


Fig. 27. Ruta de biodegradación propuesta de DEHF por *F. culmorum*. Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.

## **7.11. Ruta de degradación del DBF**

### **7.11.1 Ruta de degradación de DBF por *P. ostreatus***

La biodegradación de DBF se puede dar por una reacción de desesterificación por acción de la enzima esterasa para formar MBF y butanol. Por un lado, el MBF se metaboliza a ácido ftálico (AF) a través de una hidrólisis del éster del MBF. Por otro lado, el butanol por una reacción de oxidación se convierte a butiraldehído. El butiraldehído se convierte a ácido butírico por una reacción de oxidación. El ácido butírico se metaboliza a ácido acético por una reacción de hidrólisis. Posteriormente, el ácido acético se metaboliza completamente en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Fig. 28).

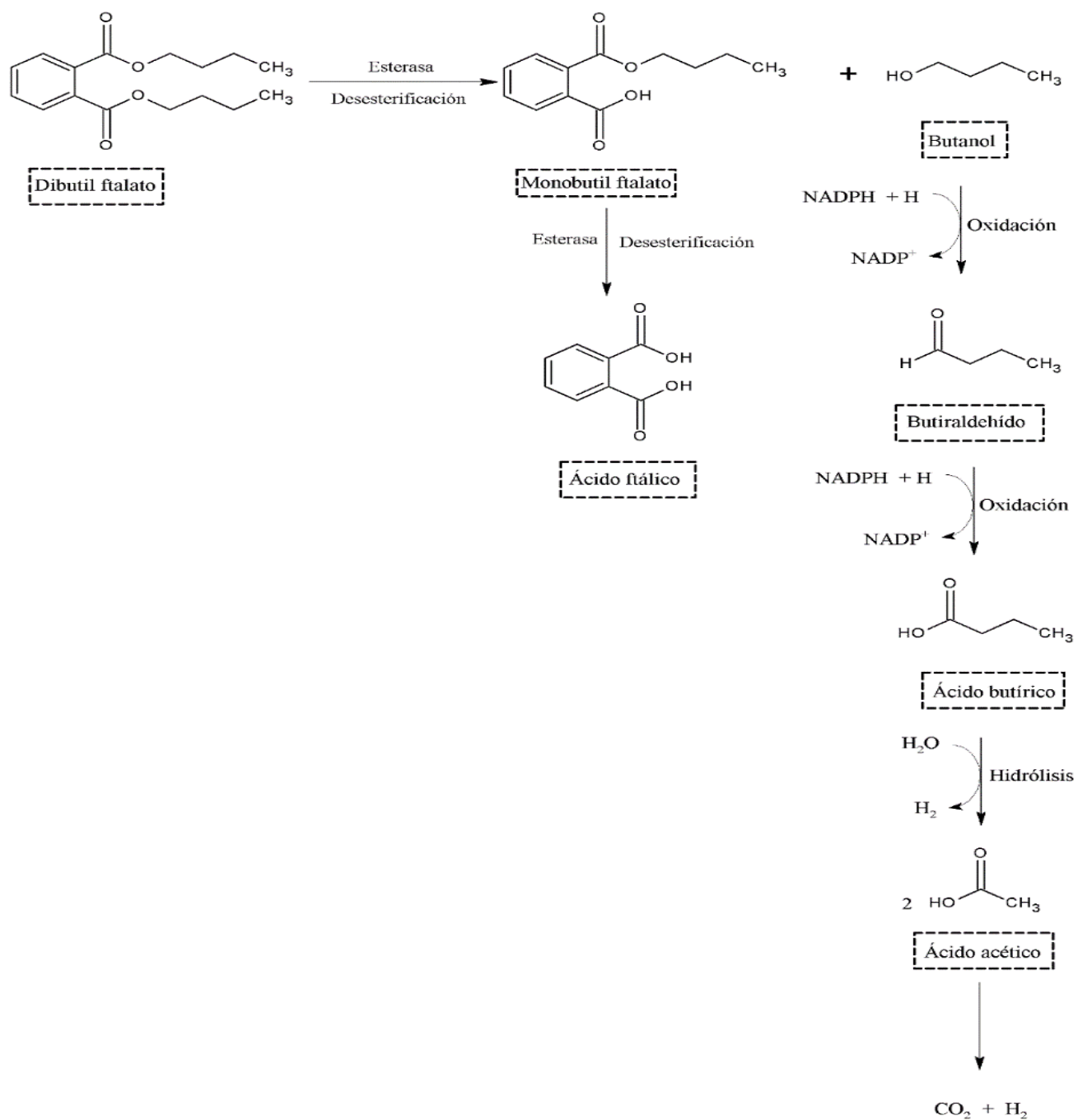


Fig. 28. Ruta de biodegradación propuesta de DBF por *P. ostreatus*. Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.

### 7.11.2. Ruta de degradación de DBF por *F. culmorum*

El DBF por un impedimento estérico de los átomos de oxígeno de los carbonos carbonilos en una reacción de demetilación por acción de la isomerasa se puede convertir a 2-metylbutylpropyl ftalato (MBFF). Después, el MBFF es metabolizado por una hidrólisis enzimática del éster de MBFF para formar a ácido ftálico (AF) por acción de una esterasa ocurriendo una desesterificación (Fig. 29).

Por otro lado, la biodegradación de DBF se puede dar también por una hidrólisis enzimática del éster del DBF con la formación de MBF. El MBF se metaboliza a AF a través de una hidrólisis del éster del MBF. El ácido ftálico se convierte en dos compuestos diferentes por una reacción de Anti Diels-Alder y por un efecto de resonancia de los electrones. Por una parte, a) el AF se convierte a (1Z, 3Z)-1,4-dihidroxibuta-1,3-diene-1,4-diolato (DHDD) por un efecto de resonancia de los electrones. El DHDD por un efecto de resonancia de los electrones de la molécula y un efecto de resonancia se convierte a ácido fumárico. Posteriormente, el ácido fumárico podría entrar al ciclo del ácido cítrico para ser metabolizado completamente a CO<sub>2</sub> y agua (Fig. 29).

Por otra parte, b) el AF por una reacción de Anti Diels-Alder se convierte a But-1-en-yne (BEYNE). El BEYNE se convierte a (2Z)-2-butene-1,4-diol (ZBD) por una oxidación. El ZBD se convierte en (2Z)-but-2-enedial (ZBDIAL) por una reacción de oxidación. El ZBDIAL se convierte a ácido málico (MA) por una reacción de oxidación.

Posteriormente, el ácido málico podría entrar al ciclo del ácido cítrico para ser mineralizado completamente a CO<sub>2</sub> y agua (Fig. 29).

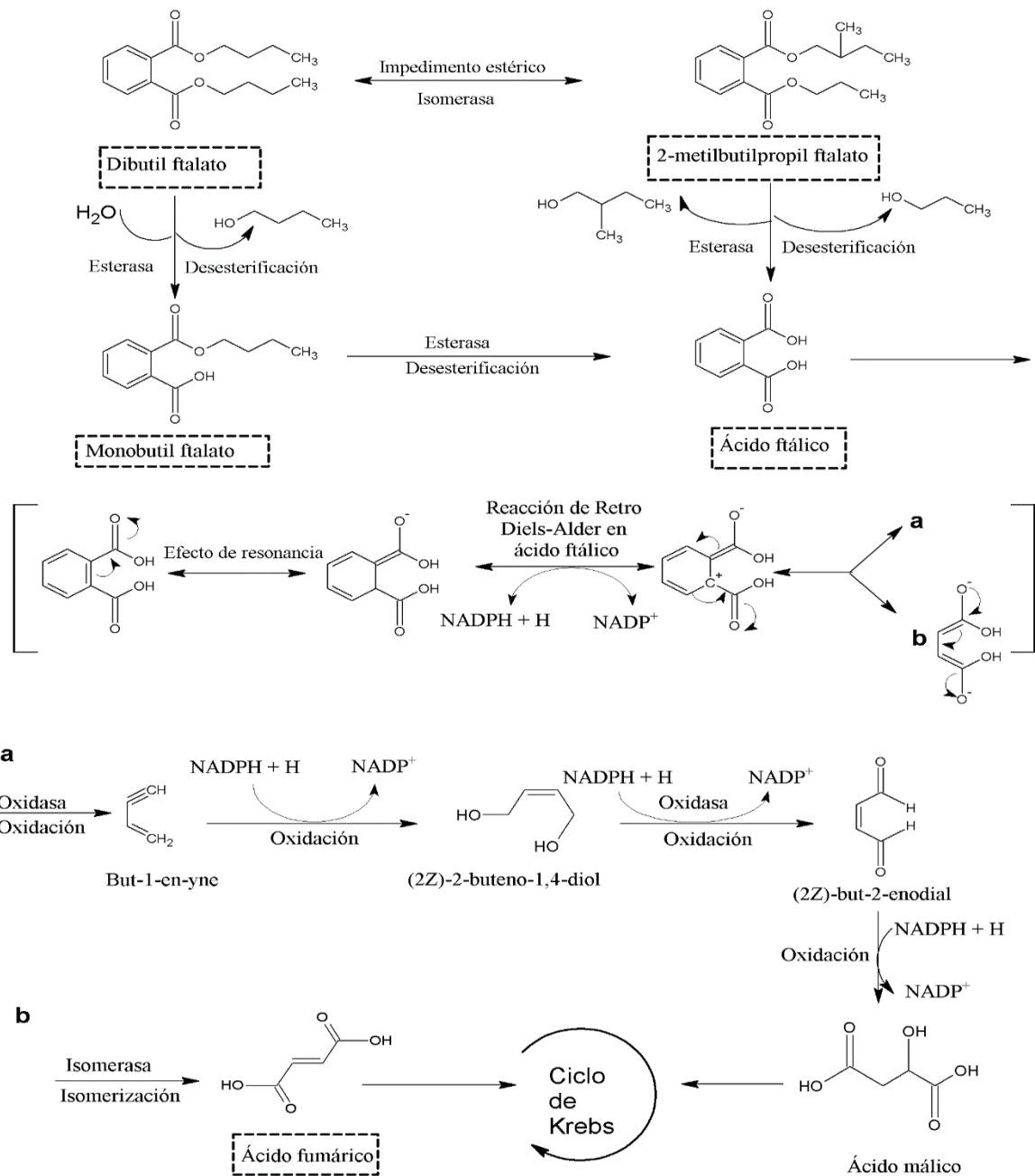


Fig. 29. Ruta de biodegradación propuesta de DBF por *F. culmorum*. Las líneas punteadas muestran los compuestos identificados por GC/MS.



## 8. DISCUSIÓN

Córdoba-Sosa et al. (2014a) evaluaron el crecimiento de *P. ostreatus* en un medio que contenía glucosa, extracto de levadura y sales minerales más la adición de 750, 1200 y 1500 mg/l de DEHF. Encontraron que conforme incrementaba la concentración del DEHF aumentaba la producción de la biomasa, teniendo que la mayor  $X_{m\acute{a}x}$  obtenida por *P. ostreatus* fue de 8.41 g/l y una  $\mu$  de 0.053 h<sup>-1</sup>. En la presente investigación se utilizó el mismo medio de cultivo que Córdoba-Sosa et al. (2014a), al mismo pH inicial de crecimiento como testigo positivo para el crecimiento de *P. ostreatus* y *F. culmorum*. Sin embargo, se obtuvo una  $X_{m\acute{a}x}$  en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF menor a la reportada por Córdoba-Sosa et al. (2014a). Tlecuitl-Beristain et al. (2008) utilizaron una cepa diferente de *P. ostreatus*, y lo crecieron en un medio de cultivo suplementado con sulfato de amonio a un pH inicial de crecimiento de 6.0. Obtuvieron valores de  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup> y una  $X_{m\acute{a}x}$  de 7.8 g/l. Téllez-Téllez et al. (2008) crecieron *P. ostreatus* en fermentación líquida y sólida utilizando un medio de cultivo suplementado con extracto de levadura a pH inicial de crecimiento de 6.5. Observaron valores de  $\mu$  de 0.022 y 0.033 h<sup>-1</sup>, respectivamente. La  $X_{m\acute{a}x}$  fue de 5.5 y 4.5 g/l para la fermentación líquida y sólida, respectivamente. En la presente investigación se utilizó el mismo medio de cultivo y pH inicial de crecimiento empleado por Téllez-Téllez et al. (2008) y se encontró, al igual que lo reportado por Tlecuitl-Beristain et al. (2008), valores similares de  $\mu$  y  $X_{m\acute{a}x}$  en *P. ostreatus* crecidos en los medios conteniendo 500 mg/l de DEHF y 1000 mg/l de DEHF, respectivamente. Para *P. ostreatus*, la biomasa aumentaba

conforme aumentaba la concentración de ftalato. Sin embargo, los valores obtenidos en estos medios de cultivo para este hongo fueron mayores a los reportados por Téllez-Téllez et al. (2008). Aguilar-Alvarado et al. (2015) estudiaron el crecimiento de varios hongos filamentosos sobre agar adicionado con diferentes concentraciones de DEHF, estos autores reportaron que conforme aumentó la concentración del compuesto incrementó la producción de la biomasa, siendo el hongo *F. culmorum* el que produjo la mayor biomasa en el medio de 1500 mg/l de DEHF.

Téllez-Téllez et al. (2012) evaluaron el consumo de glucosa por *P. ostreatus* crecido en medio líquido, utilizando el medio GYE que se utilizó en la presente investigación, encontrando que la cepa de *P. ostreatus* consume en su totalidad la glucosa a las 300 h de fermentación. En la presente investigación, el consumo de glucosa (medio GYE) ocurre a las 300 h de fermentación, al igual que lo reportado por Téllez-Téllez et al. (2012), sin embargo, en los medios que contenían DEHF y DBF, el consumo de la glucosa se observó de manera más lenta conforme aumentaba la concentración de ftalato.

Ahuactzin-Pérez et al. (2014) reportaron que el pH de los medios de cultivo conteniendo sales minerales más la adición de ftalatos disminuyeron conforme transcurre la fermentación líquida, debido a la formación de ácidos hexadecanoicos y octadecanoicos. Díaz et al. (2013) reportaron que el pH de los cultivos de *P. ostreatus* conteniendo glucosa, extracto de levadura y sales minerales, se mantuvieron al mismo pH con respecto al pH inicial de crecimiento o se aumentaron mientras transcurrieron los días de fermentación debido a la formación de compuestos aminados con carga

negativa permitiendo la formación de grupos OH en los medios. Con respecto al pH, en la presente investigación, se observó que en los cultivos de *P. ostreatus* conteniendo ftalatos, el pH disminuyó conforme transcurrieron los días de fermentación. El pH de *F. culmorum* incrementaron en los medios con adición de los ftalatos. *P. ostreatus* es un hongo lignocelulósico, excelente productor de enzimas lacasas, por lo que necesita disminuir su pH para que estas enzimas puedan realizar sus acciones catalíticas, debido a que muestran mayor actividad enzimática a pH ácidos (Díaz et al. 2011b; Díaz et al. 2013).

Existen enzimas implicadas en la degradación de ftalatos, estas enzimas actúan en diferentes niveles de la degradación. Hwang et al. (2012) reportaron la presencia de esterasas y lacasas como principales enzimas involucradas en la degradación de BBF por *P. ostreatus*, mostrando valores de actividad de esterasas superiores a los de lacasas. Mientras que Tanaka et al. (2000) reportaron que la presencia de lacasas en la degradación de ésteres de ftalato es indispensable para la ruptura del anillo aromático, posterior a la ruptura del enlace éster por acción de las esterasas. Díaz et al. (2011) evaluaron diferentes parámetros cinéticos de producción ( $E_{m\acute{a}x}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $P$  y la  $q_p$ ) en diversas cepas del género *Pleurotus* crecido en dos diferentes medios de cultivo; uno con la adicción de Cu y otro sin la adicción de Cu. Observaron que en el medio de cultivo conteniendo Cu, la cepa de *P. ostreatus* 83 mostró valores mayores en los parámetros cinéticos de producción de la enzima lacasa. En la presente investigación, comparada con el estudio previamente mencionado, se observó que la cepa de *P. ostreatus* usada en este estudio, en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF obtuvo

el doble de la producción de lacasas y de los parámetros cinéticos de producción de la enzima. Córdoba-Sosa et al. (2014b) estudiaron el crecimiento y producción enzimática de lacasas y esterases de *P. ostreatus* crecido sobre diferentes concentraciones de DEHF. Reportaron que los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción son mayores en el medio que contiene la mayor concentración de DEHF, al igual que lo reportado en esta investigación. Yeo et al. (2008) evaluaron el incremento de la producción de la enzima lacasa de *P. tremellosa* (hongo basidiomiceto) crecido sobre diferentes disruptores endócrinos: DEF, BBF y BFA. En este estudio observaron mayor actividad de lacasas en el medio que contenía BFA. Asimismo, en el presente trabajo, se encontró mayor actividad de lacasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF para el hongo *P. ostreatus*.

Córdoba-Sosa et al. (2014a) evaluaron la actividad de enzimas esterases del hongo *P. ostreatus* en diferentes concentraciones de DEHF, observaron que en el medio que contenía 1500 mg/l de DEHF presentó la mayor actividad de enzimas esterases y esta producción fue durante la fase estacionaria de crecimiento. González- Márquez et al. (2015) evaluaron la actividad enzimática de esterases del hongo *L. edodes* desarrollado en diferentes medios de cultivo con diferentes concentraciones de DEHF (750, 1200 y 1500 mg/l), *L. edodes* presentó mayor actividad de esterases en el medio con 1500 mg/l de DEHF. En la presente investigación, se observó que *F. culmorum* presentó la mayor actividad de esterases en los medios de 1000 mg/l de DEHF y 1000 mg/l de DBF y conforme aumentaba la concentración de los compuestos aumentaba la producción de la enzima. Lo que nos permitió sugerir que ninguno de estos

compuestos inhibió la producción de esterasas. DEHF y DBF participan como inductores de estas enzimas, debido a que las células de estos hongos reconocen estos compuestos activando la expresión de algunas isoformas de esterasas.

Hwang et al. (2008, 2012) evaluaron la biodegradación de 100 mg/l de DMF, DEF y BBF/l, respectivamente, utilizando diferentes cepas de hongos, incluyendo *P. ostreatus*. Observaron que, a los 6 días de crecimiento, el hongo *P. ostreatus* fue capaz de degradar el 100% de los tres ftalatos utilizados. Zhu-Hua et al. (2011) estudiaron la biodegradación de 100 mg/l de DMF, Dimetil isoftalato (DMI) y Dimetil tereftalato (DMT) utilizando el hongo *Trichosporon* sp. DMI-5-1. Observaron que este hongo fue capaz de degradar 75.52 % de los tres ftalatos a las 576 h de incubación. Lee et al. (2007) reportaron que el hongo de pudrición blanca *Polyporus brumalis*, es capaz de degradar cerca de 350 mg/l de DBF dentro de las 288 h de crecimiento. Begum et al. (2003) evaluaron la biodegradación de 0.5 mg/l de DEF, DBF y BBF, respectivamente, en medio líquido utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Observaron que, a las 72 h de crecimiento, el hongo fue capaz de degradar el 96% de DBF, 90% de BBF y 62% de DEF. Estos autores no reportaron compuestos como productos de degradación de estos ftalatos. Ji-Young et al. (2006) estudiaron la biodegradación de Dipentil ftalato (DPF) en medio líquido a una concentración de 5000 mg/l de DPF. Reportaron que, a las 10 h de crecimiento, el hongo *F. oxysporum* fue capaz de degradar el 80% de ftalato utilizado. Wen et al. (2014) reportaron que la cepa de *Arthrobacter* sp. fue capaz de degradar 20 mg/l de DEHF y la tasa de degradación alcanzó aproximadamente 52% después de las 72 h de incubación. El porcentaje de biotransformación de DEHF por

*Sphigomonas* sp. y *Corynebacterium* sp. fue de 11.5 y 11.2 %, respectivamente (con una concentración inicial de 5 mg/l) a las 168 horas (Chang et al. 2004).

Kim et al. (2007) reportaron que la enzima purificada cutinasa de *F. oxysporum* descompone cerca del 70 % de dihexil ftalato (DHF) (con una concentración inicial de 10 mg/l) dentro de la 4.5 h, mientras que la enzima comercial de esterasa (de *Candida cylindracea*) degrada aproximadamente el 10% de la concentración inicial de DEHF después de 3 días de tratamiento. Kim et al. (2003) también estudio la degradación de DEHF (500 mg/l) usando una enzima cutinasa purificada (de *F. oxysporum*) y la enzima comercial esterasa (de *C. cylindracea*) encontrando que el 70% inicial de DEHF fue descompuesto por la enzima cutinasas dentro de la 2.5 h, pero solo el 15% aproximadamente de DEHF fue degradado por la enzima esterasa dentro de los 3 días. En la presente investigación, se reportó que *P. ostreatus* fue capaz de degradar el 93.83 % y 94.65 % de la concentración inicial de 1000 y 500 mg/l de DEHF, respectivamente, después de las 336 h de fermentación. De igual manera, *P. ostreatus* degradó el 85.2 % y 99.73 % de 1000 y 500 mg/l de DBF, respectivamente. *F. culmorum* degradó el 99 % y 98 % de 1000 y 500 mg/l de DEHF, respectivamente, a las 144 h de fermentación.

En el caso de DBF, el hongo fue capaz de degradar 99 % y 98 % de la concentración inicial de 1000 y 500 mg/l de DBF, respectivamente. Hu et al. (2015) reportaron una  $k$  de  $0.026 \text{ h}^{-1}$  en 100 mg/l de DBF empleando un biorreactor de bioestimulación en el cual crecieron *Micrococcus* sp. Gao y Chi (2015) estudiaron la biodegradación de 2000 mg/l de DBF empleando las microalgas *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella salina* y

*Chaetoceros muelleri*, obteniendo una  $k$  de 0.0169 h<sup>-1</sup>, 0.0035 h<sup>-1</sup> 0.0034 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Gavala et al. (2003) reportaron la  $k$ , de una concentración mayor da 150 mg/l de DEHF presente en lodos activados, empleando un digestor anaeróbico mesófilo, obteniendo una  $k$  de 0.0035 d<sup>-1</sup> y 0.0359 d<sup>-1</sup>. Estos autores reportaron que ftalatos de alto peso molecular, como DEHF, no son biodegradados bajo condiciones metanogénicas. Xu et al. (2005) reportaron una  $k$  de 0.028 y 0.048 h<sup>-1</sup> en 2.5 y 10 mg/l de DBF utilizando la bacteria *Pseudomonas fluorescens* B-1. En el presente estudio, se reportó una  $k$  de 0.024 h<sup>-1</sup> y 0.24 h<sup>-1</sup> en 1000 y 500 mg/l de DEHF, respectivamente; y 0.023 h<sup>-1</sup> y 0.016 h<sup>-1</sup> en 1000 y 500 mg/l de DBF respectivamente, utilizando el hongo *F. culmorum*. *P. ostreatus* mostró una  $k$  en 1000 y 500 mg/l de DEHF fue de 0.0081 h<sup>-1</sup> y 0.0083 h<sup>-1</sup>, respectivamente. *P. ostreatus* mostró una  $k$  de 0.0059 h<sup>-1</sup> y 0.017 h<sup>-1</sup> en los medios conteniendo 1000 y 500 mg/l de DBF, respectivamente.

Zhu-Hua et al. (2011) estudiaron la biodegradación de 100 mg/l de DMF, Dimetil isoftalato (DMI) y Dimetil tereftalato (DMT) utilizando el hongo *Trichosporon* sp. DMI-5-1. Encontraron como productos de degradación, monometil isoftalato (MMI), monometil ftalato (MMF), monometil tereftalato (MMT) y AF. Lee et al. (2007) reportaron DBF por una reacción de transesterificación puede convertirse a DEF y posteriormente a AF anhidro. Asimismo, el DBF, por una reacción de desesterificación se puede convertir a MBF y posteriormente a AF anhidro. Estos productos de degradación se identificaron utilizando la técnica de GC-MS. En el presente estudio, utilizando la técnica de GC-MS y el modelo de química cuántica, se encontraron los intermediarios empleados para proponer la ruta de degradación de DEHF y DBF. Se

reportaron los productos de la degradación empleados para proponer la ruta de degradación de ambos ftalatos por *P. ostreatus*, teniendo que el DEHF se convirtió en MEHF, AF, etanol y hexanal. El DBF se transformó en MBF, butanol y AF. *P. ostreatus* fue capaz de mineralizar el DBF a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Para *F. culmorum*, se sugirió que el DEHF se transforma a MEHF y posteriormente a un intermediario de la fermentación butanediólica. Por su parte, el DBF fue biodegradado en MBF y posteriormente, en intermediarios del ciclo de Krebs.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

- *P. ostreatus* utilizó concentraciones de DEHF como fuente de carbono y energía.
- *P. ostreatus* degradó el 85.2 % de la cantidad inicial de DBF (1000 mg/l) después de las 336 h de crecimiento y el 99.73 % de 500 mg/l de DBF a las 336 h de incubación.
- *F. culmorum* fue capaz de degradar el 95 % de la cantidad utilizada de DEHF (1000 mg/l) dentro de las 60 h de su crecimiento.
- *F. culmorum* utilizó altas concentraciones de DBF como fuente de carbono y energía (degradó cerca del 100% a las 180 h de crecimiento).
- *P. ostreatus* y *F. culmorum* mostraron alta actividad de lacasas y estererasas en los medios de cultivo probados.
- *P. ostreatus* mostró mayor producción y actividad de lacasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF.



- *F. culmorum* mostró mayor producción y actividad de esterasas en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF.
- *P. ostreatus* metabolizó rápidamente DEHF a ácido ftálico, ácido acético y hexanal. Y el DBF fue metabolizado a ácido ftálico y ácido acético. Éste, posteriormente, lo mineralizó completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.
- El hongo *F. culmorum* fue capaz de metabolizar rápidamente DEHF obteniendo como producto final butanediol y el DBF fue metabolizado a ácido fumárico y ácido málico.
- *P. ostreatus* y *F. culmorum* ofrecen un gran potencial en la biorremediación de lugares contaminado con DEHF y DBF.
- Este trabajo es el primer estudio en el que se propone una ruta de degradación, empleando química cuántica, de DEHF y DBF por hongos filamentosos utilizando elevadas concentraciones de estos plastificantes.

## 10. CONCLUSIÓN

*P. ostreatus* mostró la mayor  $X_{m\acute{a}x}$  en el medio de cultivo con mayor cantidad de grupos carbono, la producción de biomasa para ambas cepas es directamente proporcional al incremento de la concentración de ftalato. La mayor actividad específica de lacasas la mostró *P. ostreatus* debido a que es un hongo naturalmente lignolítico, sin embargo, *F. culmorum* fue el hongo que produjo mayor actividad de enzimas esterasas. La mayor producción de ambas enzimas se presentó en los medio con mayor

concentración de los compuestos y disminuyó conforme disminuye la concentración del respectivo compuesto. Estos resultados nos permiten sugerir que tanto las enzimas lacasas como las esterasas podrían ser inducidas con la presencia de este tipo de compuestos.

Los metabolitos formados durante la degradación corresponden a los perfiles del pH que muestra el hongo durante su crecimiento ya que los monoésteres de estos son de características ácidas. *F. culmorum* mostró la mejor tasa de degradación de DEHF y DBF gracias al sistema esterolítico que presenta, sin embargo, *P. ostreatus* mineralizó por completo ambos compuestos. Las enzimas esterasas están directamente involucradas en la degradación de éste tipo de compuestos por lo que se sugiere que pueden ser empleadas en procesos de biorremediación de sitios contaminados por ésteres del ácido ftálico.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3357-3362.
- Adibi J.J., Perera F.P., Jedrychowski W., Camann D.E., Barr D., Jacek R., Whyatt R.M. 2003. Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. *Environmental Health Perspectives*, 111:1719-1722.

- Aguilar-Alvarado Y., Báez-Sánchez M.R., Martínez-Carrera D., Ahuactzin-Pérez M., Cuamatzi-Muñoz M., Sánchez C. 2015. Mycelial growth and enzymatic activities of fungi isolated from recycled paper wastes grown on di (2-ethylhexyl) phthalate. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24:1897-1902.
- Ahn J., Kim Y., Min J., Lee J. 2006. Accelerated Degradation of dipentyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminescent bacteria. *Current Microbiology*, 52:340-344.
- Ahuactzin-Pérez M., Torres J.L., Rodríguez-Pastrana B.R., Soriano-Santos J., Díaz-Godínez G., Díaz R., Tlecuitl-Beristain S., Sánchez C. 2014. Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the basis of fungal and bacterial growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30:2811-2819.
- Akar T., Divriklioglu M. 2012. Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of Reactive Red 2 contaminated solutions: batch and dynamic flow mode studies.
- Begum A., Katsumata H., Kaneco S, Suzuki T., Ohta K. 2003. Biodegradation of phthalic acid esters by bakery yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70:255-261.
- Bhardwaj H., Gupta R., Tiwari A. 2012. Microbial population associated with plastic degradation. *Scientific reports*, 1(5):272.
- Borchers A., Teuber S., Keen C. 2009. Food Safety. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 39:95-141.

- Bustamante M.P., Lizama S.B., Olaíz F.G. 2001. Ftalatos y efectos en la salud. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 17:205-215.
- CERHR. 2006. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, NTP-CERHR-DEHF-05. Disponible en <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/DEHF/DEHF-Monograph>.
- Chai W., Suzuki M., Handa Y., Murakami M., Utsukihara T., Honma Y., Nakajima K., Saito M., Akira A. 2008. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by fungi. National Food Research Institute, 72: 83-87.
- Chang B.V., Wang T.H., Yuan S.Y. 2007. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. Chemosphere, 69:1116-1123.
- Chang B.V., Yang C.M., Cheng C.H., Yuan S.Y. 2004. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains. Chemosphere 55:533-538
- Chatterjee S., Dutta T.K. 2008. Complete degradation of butyl benzyl phthalate by a defined bacterial consortium: role of individual isolates in the assimilation pathway. Chemosphere, 70:933-941.
- Chaverri P., Samuels G.J. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 27:302-313.

- Chávez R., Bull P., Eyzaguirre J. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, 123:413-433.
- Choi S., Park S., Jeong J., Cho E., Phark S., Lee M., Kwak D., Lim J., Jung W., Sul D. 2010. Identification of toxicological biomarkers of di (2-ethylhexyl) phthalate in proteins secreted by HepG2 cells using proteomic analysis. *Proteomics*, 10:1831-1846.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology* 179:145-150.
- Conrad S., Sung G., Giráldez F., Townsend J., Miadlikowska J., Hofstetter V., Robbertse B. 2009. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2):224-239.
- Córdoba-Sosa G., González-Márquez A., Torres J.L., Ahuactzin-Pérez M., Díaz-Godínez G., Díaz R., Cuamatzi-Muñoz M., Sánchez C. 2014a. Growth of *Pleurotus ostreatus* on different concentrations of di (2-ethyl hexyl) phthalate in solid and in liquid media. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4(5):2249-1929.
- Córdoba-Sosa G., González-Márquez A., Ahuactzin-Pérez M., Torres J.L., Díaz-Godínez G., Díaz R., Sánchez C. 2014b. Growth of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* on different concentrations of di (2-ethyl hexyl) phthalate in solid and in liquid media. In: 8th International Conference on Mushroom Biology

- and Mushroom Products, New Delhi, India, 231-237.
- Crueger W., Crueger A. 1993. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial, Ed. Acribia.
- Deacon J.W. 1990. Introducción a la micología moderna. Limusa-Noriega, México.
- Díaz R., Alonso S., Sánchez C., Tomasini A., Bibbins-Martínez M.D., Díaz-Godínez G. 2011a. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Bioresources*, 6(1):282-290.
- Díaz R., Sánchez C., Bibbins Martinez M., Díaz-Godínez G. 2011b. Effect of medium pH on laccase zymogram pattern produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 5(18):2720-2723.
- Díaz R., Téllez-Téllez M., Bibbins-Martínez M.D., Sánchez C., Díaz-Godínez G., Soriano-Santos J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and expression profiles of laccases produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electron Journal Biotechnology*, 16(4):6.
- DiGanji J. 1999. Phthalates in vinyl medical products. Washington DC: Greenpeace USA.
- Dobrzyńska M, Ewa J.T., Derezińska E., Pachocki K. 2012. Two generation reproductive and development toxicity following subchronic exposure of pubescent male mice di (2-ethylhexyl) phthalate. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(1):31-37.
- Ertugay N., Bayhan Y.K. 2010. The removal of copper (II) ion by using mushrooms biomass (*Agaricus bisporus*) and kinetic modeling. *Desalination*, 255:137-142.

- European Chemicals Agency (ECHA). 2010. Evaluation of new scientific evidence concerning the restrictions contained in Annex XVII to regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH). Review of New available information for dibutyl phthalate (DBP). Review Report. Disponible en: [http://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dbp\\_echa\\_review\\_report\\_2010\\_6\\_en.pdf](http://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dbp_echa_review_report_2010_6_en.pdf)
- Fazenda M.L., Seviour R., Mcneil B., Harvey L.M. 2008. Submerged culture fermentation of “higher fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, 63:33-103.
- Fromme H., Bolte G., Koch H.M., Angerer J., Boehmer S., Drexler S., Mayer R., Liebl B. 2007. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(1):21-33.
- Futoshi S., Ichijo N., Yamaguchi H., Nakatsumi H., Ando A., Iijima N., Oguri S., Uehara K., Nagata Y. 2004. Molecular properties of mycelial aggregate specific ectin of *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(4):257-262.
- Gao J., Chi J. 2015. Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1-2):70-75.

- Gavala H.N., Alatraste-Mondragon F., Iranpour R., Ahring B.K. 2003. Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere*, 52:673-682.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M. 1999. Laccases: A useful group of oxide reductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3:1-26.
- González-Márquez A., Ahuactzin-Pérez M., Sánchez C. 2015. *Lentinula edodes* grown on di (2-ethylhexyl) phthalate-containing media: micelial growth and enzyme activities. *Bioresources*, 10(4):7898-7906.
- González-Pérez M., García-Barrera F.A., Méndez-Díaz J.F., González-Torres M., López-Oglesby J.M. 2014. Theoretical calculation of electron transfer coefficient for predicting the flow of electrons by PM3, using 20 amino acids and nicotine. *European Scientific Journal*, 10:42-49.
- Goyal M., Soni G. 2011. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *African Journal of Microbiology Research*, 5:1131-1136.
- Grimm L., Kelly S., Krull R., Hempel D. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:375–384.
- Gutiérrez M.C., Droguet M. 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter*, 122:35-41.



- Hashizume K., Nanya J., Toda C., Yasui T., Nagano H., Kojima N. 2002. Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25:209-214.
- Hauser R., Calafat A.M. 2005. Phthalates and human health. *Occupational and Environmental Medicine*, 62:806-818.
- Herrera T., Ulloa M. 1998. El reino de los hongos. En: *Micología básica y aplicada*. Editorial Fondo de Cultura Económica. México DF. p. 552.
- Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5):623-634.
- Hu J., Yang Q., Wang J.L. 2015. Biodegradation of di-n-butyl phthalate in sequencing batch reactor bioaugmented with *Micrococcus* sp. and the bacterial community analysis. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2819-2828.
- Huber W., Grasl-Kraupp B., Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic potential of di (2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. *Critical Reviews in Toxicology*, 26:365-481.
- Hwang S., Kim H.Y., Ja K.O., Song H.G. 2012. Changes in the activities of enzymes involved in the degradation of butylbenzyl phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2):239-243.

- Hwang S., Soon-Seok K., Hyoung T., Hong-Gyu S. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4):767-772.
- Ingraham J., Ingraham C. 1995. *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverte. Barcelona.
- Institute for Health and Consumer Protection Toxicology and Chemical Substance (TCS). 2008. Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Summary Risk Assessment Report. European Chemicals Bureau. Available at: <http://echa.europa.eu/documents/10162/060d4981-4dfb-4e40-8c69-6320c9debb01>.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. 1999. Bacterial Biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53:315-351.
- Ji-Young A., Yang-Hoon K., Jiho M., Jeewon L. 2006. Accelerated degradation of dipentyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminescent bacteria. *Current Microbiology*, 52:340-344.
- Kamrin, M.A. 2009. Phthalate risk, phthalate regulation, and public health: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12(2):157-174.
- Kendrick B. 1985. *The Fifth Kingdom*. Mycologue Publications. Waterloo, Ontario.

- Kim H.Y., Song H.G. 2000. Comparison of 2, 4,6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. *Current Microbiology*, 41:317-320.
- Kim Y.H., Lee J. 2005. Enzymatic degradation of dibutyl phthalate and toxicity of its degradation products. *Biotechnology Letters*, 27:635-639.
- Kim Y.H., Lee J., Ahn J.Y., Gu M.B., Moon S.H. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, *Fusarium oxysporum* f. *pisi* cutinase. *Environmental Microbiology*, 68:4684-4688.
- Kim Y.H., Lee J., Moon S.H. 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:75-80.
- Kim Y.H., Seo H., Min J., Kim Y., Ban Y., Han K., Park J., Bae K., Gu M., Lee J. 2007. Enhanced degradation and toxicity reduction of dihexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. *pisi* cutinase. *Journal of Applied Microbiology*, 102:221-228.
- Larraya L.M., Pérez G., Penas M.M., Baars J.J., Mikosch T.S., Pisabarro A.G., Ramírez L. 1999. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3413-3417.
- Latini G. 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*, 361 (1-2):20-29.
- Latini G., De Felice C., Del Vecchio A., Paris I., Ruggieri F., Mazzeo P. 2003. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 111(14):1783-1785.

- Lee S., Koo B., Lee S., Kim M., Choi D., Hong E., Jeung E., Choi I. 2004. Biodegradation of dibutyl phthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:417-423.
- Lee S., Lee J., Koo B., Kim M., Choi D., Choi I. 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus *Polyporus brumalis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:1516-1522.
- Lehmann K.P., Phillips S., Sar M., Foster P.M., Gaido K.W. 2004. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (*n*-butyl) phthalate. *Toxicological Sciences*, 81:60-68.
- Liang D., Zhang T., Herbert H., He J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Journal of Applied Microbiology*, 80: 183-198.
- Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä ME. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:877-896.
- Macedo G., Fontes T. 2005. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36:388-394.
- Madigan M., Martinko J., Parker M. 2005. *Brock Biología de los microorganismos*. Editorial Pearson Educación. Madrid.
- Mata G., Salmones D. 2003. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology In México. *Micología Aplicada International*, 15:23-29.

- Matsumoto M., Mutsuko H., Makoto E. 2008. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50:37-49.
- Mendoza A. 2008. Listado adicional al convenio de Estocolmo: sustancias de uso industrial. Ftalatos. Capítulo 5. Instituto Nacional de Ecología.
- Menéndez V.J., Oliveros P. 2004. Hongos basidiomycetes. Características generales. Disponible en:  
<http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomycetes.php>
- Miller G. 1959. Use of dinitrosalicilic acid for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3):426-428.
- Moore-Landecker E. 1996. *Fundamentals of the Fungi*. Prentice Hall, pp. 547.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) In consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). 1992. *Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse*. Recuperado de <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.
- Odunola O.A., Semire B. 2007. Conformational analysis (semi empirical PM3) and electronic properties of functionalized oligo(hexylpyrroles). *European Journal of Chemistry*, 4:363-371.

- Ramírez L., Larraya L.M., Pisabarro A.G. 2000. Molecular tools for breeding basidiomycetes. *International Microbiology*, 3:147-152.
- Reinsberg J., Wegener-Topfer P., Ven K., Ven H., Klingmueller D. 2009. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239:116-123.
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27:185-194.
- Schettler T. 2006. Human exposure to phthalates via consumer products. *International Journal of Andrology*, 29(1):134-139.
- Schwarze F., Engels J., Mattheck C. 2000. Fungal strategies of wood decay in trees. Springer Verlag, Berlín.
- Silva M.J., Barr D.B., Reidy J.A. 2003. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Archives of Toxicology*, 77:561-567.
- Singh S, Shue-Lung L. 2011. Phthalates: Toxicogenomics and inferred human diseases. *Genomics* 97:148-157.
- Smith WG. 2002. *Fusarium culmorum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, p. 31.
- Stamets P., Chilton J.S. 1983. The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home. Agaricon Press, Olympia, Washington DC, p. 415.
- Subotic U., Hannmann T., Kiss M., Brade J., Breitkopf K., Loff S. 2007. Extraction of the plasticizers diethyl hexyl phthalate and polyadipate from polyvinylchloride

nasogastrics tubes through gastric juice and feeding solution. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44(1):71-76.

Subramaniyam R., Vimala R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3(3):480-486.

Swan S.H., Main K.M., Liu F., Stewart S.L., Kruse R.L., Calafat A.M., Mao C.S., Redmon J.B., Sullivan S., Teague J.L. 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113(8):1056-1061.

Tanaka T., Yamada K., Tonosaki T., Konishi T., Goto H., Taniguchi M. 2000. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. *Water Science and Technology*, 42:89-95.

Tari C., Göğüs N., Tokatli F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1108-1116.

Téllez-Téllez M., Fernández F.J., Montiel-González A.M., Sánchez C., Díaz- Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus* in submerged and solid- state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4):675-679.

Téllez-Téllez M., Sánchez C., Díaz R., Díaz-Godínez G. 2012. Zymogram patterns of extracellular laccases of *Pleurotus* species grown on non-inducer agar medium. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3):383-38.

- Tlecuítl-Beristain S., Sánchez C., Loera O., Robson G.D., Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*, 112(9):1080-1084.
- Valencia del Toro G. 2002. Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México; México, D.F.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar N.C., Romero-Gómez S.J., Díaz-Godínez G., Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13:157-167.
- Wen Z.D., Gao D.W., Wu W.M. 2014. Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:4683-4690.
- Whangsuk W., Sungkeeree P., Nakasiri M., Thiengmag S., Mongkolsu, S., Loprasert S. 2015. Two endocrine disrupting dibutyl phthalate degrading esterases and their compensatory gene expression in *Sphingobium* sp. SM42. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99:45-54.



- Xavier-Santos S., Carvalho C.C., Bonfá M., Silva R., Capelari M., Gomes E. 2004. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia Microbiologica*, 49(1):46-52.
- Xu X.R., Li H.B., Gu J.D. 2005. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-*n*-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55:9-15.
- Yeo S., Park N., Song H.G., Choi H.T. 2007. Generation of a transformant showing higher manganese peroxidase (MnP) activity by overexpression of MnP gene in *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology*, 45: 213-218.
- Zeng F., Cui K., Li X., Fu J., Sheng G. 2004. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1. *Procces Biochemistry*, 39:1125-1129.
- Zheng Z., He P.J., Shao L.M., Lee D.J. 2007. Phthalic acid esters in dissolved fractions of landfill leachates. *Water Research*, 41:4696-4702
- Zhu H. 2010. Degradation of three dimethyl phthalate isomer esters (DMPEs) by mangrove sediment fungi. Doctor of philosophy. City University of Hong Kong. Tesis de doctorado.
- Zhu-Hua L., Ka-Lai P., Yi-Rui W., Ji-Dong G., Chow R.K., Vrijmoed L. 2012. Degradation of phthalate esters by *Fusarium* sp. DMT-5-3 and *Trichosporon* sp. DMI-5-1 isolated from mangrove sediments. *Progress in molecular and subcellular biology*, 53:299-328.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00085

Matricula: 2131800150

Biodegradación de ftalatos por *Pleurotus ostreatus* y *Fusarium culmorum* crecidos en medio líquido

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 1 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL  
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ  
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA  
DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MIRIAM AHUACTZIN PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

A probar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

SECRETARIO

DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa

Fecha : 31/01/2017  
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna MIRIAM AHUACTZIN PEREZ, matrícula 2131800150, quien cumplió con los 300 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha primero de febrero del 2017 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Biodegradación de ftalatos por *Pleurotus ostreatus* y *Fusarium culmorum* crecidos en medio líquido

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 435 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Secretario

DR. SAUL PRECIUTL BERISTAIN

Vocal

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Vocal

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA