

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Determinación de las condiciones de cultivo para la degradación de pentaclorofenol con *Amylomyces rouxii* por fermentación en estado sólido”

TESIS

para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

PRESENTA

Biol. Jaime Marcial Quino

DIRECTOR

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Junio 2005

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el No. de registro 0471-O”.

Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través de la beca de maestría No.172706 y del proyecto “Degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans*” (ref. 31572-B).

Iztapalapa, D. F. a 8 de junio 2005

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

“Determinación de las condiciones de cultivo para la degradación de pentaclorofenol con
Amylomyces rouxii por fermentación en estado sólido”

que presentó

Jaime Marcial Quino

Comité Tutorial:

Directora: Araceli Tomasini Campocosio

Asesor: Javier Barrios González

Asesora: Susana Saval Bohórquez

Jurado:

Presidente: Gerardo Saucedo Castañeda _____

Secretario: Javier Barrios González _____

Vocal: Susana Saval Bohórquez _____

Vocal: Refugio Rodríguez Vázquez _____

DEDICATORIA

A mis padres:

Por todo el esfuerzo que han hecho para que yo lograra esto y por darme el apoyo y cariño cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos:

A ti Maythé por el inmenso cariño que me tienes y que me has demostrado y Juan Carlos a donde quiera que estés, también es para ti.

A Yuridia Absalón:

Por esa paciencia que me has demostrado, por apoyarme en mis decisiones y escuchar mis ideas. Por que eres mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por darme la oportunidad y confianza una vez más de trabajar con ella, así como por todo su apoyo brindado durante la realización de la tesis y mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Susana Saval Bohórquez por la exhaustiva revisión de la tesis e importantes aportaciones para mejorar el documento.

Al Dr. Javier Barrios González por su asesoría para la realización de la tesis y sus comentarios durante la revisión.

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda por ayudarme en la determinación del CO₂ de los cultivos sólidos y por la revisión del trabajo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por permitirme realizar la maestría, así como a todos los profesores que participaron en mi formación.

Al M. en B. Angel Absalón por ayudarme a estudiar para las materias de la maestría y por su gran amistad.

A todos mis amigos del laboratorio (Mónica, Ana Lidia, Tania, Sandra, Paulina, Roció, Rosa, Magally, Edgar, Arturo, Jesús,) que me han ayudado y enseñado a trabajar en el laboratorio, por los ratos agradables y por todos sus buenos consejos.

RESUMEN

El hongo *Amylomyces rouxii*, un zigomiceto aislado de la industria del papel, ha demostrado tolerar y degradar eficientemente pentaclorofenol (PCF), uno de los xenobióticos de mayor persistencia y toxicidad que se encuentran en el ambiente. Se ha estudiado la degradación de PCF por *A. rouxii* en cultivo líquido y sólido. Sin embargo en fermentación sólida, empleando como soporte inerte bagazo de caña, el hongo presentó un crecimiento muy pobre, a pesar de ello si degradó el PCF.

En el presente trabajo se estudiaron algunas condiciones de cultivo con el fin de incrementar el crecimiento de *A. rouxii* y determinar su capacidad para degradar PCF. Los parámetros que se analizaron fueron: tamaño de inóculo, composición del medio (glucosa, extracto de malta, tirosina, y concentración inicial de PCF) humedad y tasa de aireación. Se demostró que la humedad inicial y la composición del medio (enriquecido con más glucosa y extracto de malta) influyen en el crecimiento de *A. rouxii*. En los cultivos con medio modificado la biomasa producida fue 8.87 mg biomasa g⁻¹ msi, mientras que en el medio normal la producción fue de 5.44 mg biomasa g⁻¹ msi ambos con 80% de humedad inicial.

En los cultivos con medio modificado y medio normal y con 12.5 mg L⁻¹ de PCF inicial, la degradación fue similar. En el cultivo con medio modificado el PCF residual fue 2.23 mg L⁻¹ y 4.06 mg L⁻¹ en el medio normal.

También se estudio el efecto de la tirosina en la degradación de PCF. La tirosina adicionada al medio de cultivo, no mostró efecto en el crecimiento de *A. rouxii* pero incrementó la capacidad de degradación de PCF. Posiblemente la tirosina actúa como inductor de las enzima(s) responsable(s) de la degradación (fenoloxidasas), en cultivos con una concentración de 0.25 g tirosina L⁻¹ y 12.5 mg L⁻¹ de PCF, la remoción fue del 100% en tan

solo 72 h. Mientras en los cultivos que no contenían tirosina la degradación de PCF fue del 82% en 96 h.

Se estudió el efecto de la concentración inicial del PCF y se observó que a concentraciones altas *A. rouxii* presenta mayor tasa de degradación, con 50 mg L⁻¹ la degradación es del 83% y del 91% con 100 mg L⁻¹ en 72 h. Con respecto al crecimiento al crecimiento, se produce más biomasa en altas concentración de PCF inicial, debido a que la eliminación del tóxico es muy rápida. Con 12.5 y 25 mg L⁻¹ crece 7.7 mg biomasa g⁻¹ msi en 96 h, con 50 mg L⁻¹ la biomasa producida fue de 10.7 mg micelio g⁻¹ msi y para 100 mg L⁻¹ de 15.3 mg biomasa g⁻¹ msi.

Se demostró que la adición de tirosina al medio de cultivo incrementa la capacidad de degradación de PCF por *A. rouxii*. También se observó que este hongo es capaz de degradar más eficientemente el PCF cuando éste se encuentra en mayor concentración inicial, hasta 100 mg L⁻¹.

ABSTRACT

The fungus *Amylomyces rouxii* is a zygomycete, isolated from the paper industry, that tolerates and degrades pentachlorofenol (PCP), one of the most persistent and toxic xenobiotic found in the environment. PCP degradation by fungi was studied in liquid and solid state cultures. In solid state culture, using sugarcane bagasse as inert support, *A. rouxii* grew poorly though 85% of initial PCP was removed at 96 h.

The aim of the present work was to determine the effect of culture conditions, as composition medium, tyrosine and PCP concentration, on *A. rouxii* growth and PCP degradation. The parameters analyzed were: the size of the inoculum, the composition of the medium (glucose, malt extract, tyrosine and PCP concentration), initial moisture and aeration rate. It was shown that the initial moisture and the medium composition (enriched with more glucose and malt extract) affected *A. rouxii* growth. Results showed that growth was higher in cultures in enriched medium, 8.87 mg biomass g⁻¹ ids, while in normal medium growth was 5.44 mg biomass g⁻¹ ids both at initial moisture of 80 % .

In cultures with enriched and normal media and with 12.5 mg L⁻¹ of initial PCP, the degradation was similar. In culture with modified medium residual PCP was 2.23 mg L⁻¹ and 4.06 mg L⁻¹ of residual PCP was found in culture with normal medium.

The effect of the tyrosine in the PCP degradation was also studied. Experiments were made adding different concentration of tyrosine. It was shown that tyrosine did no have effect in growth. However, it was observed that tyrosine increased PCP degradation by *A. rouxii*. Theses results indicate that tyrosinase, the enzyme responsible of the degradation, produce by *A. rouxii* in induced by tyrosine. In culture with 0.25 g tyrosine L⁻¹and 12.5 mg PCF L⁻¹, it was

found 100% of PCP degradation at 72h and in cultures without tyrosine PCP degradation was 82 % at 96 h.

The effect of PCP initial concentration was studied. Results showed that *A. rouxii* growth and PCP degradation were higher at high PCP initial concentration, with 12.5 and 25 mg PCF L⁻¹ biomass produced was 7.7 mg g⁻¹ initial dry substrate (ids) at 96 h, and with 50 mg PCP L⁻¹ biomass produced was 10.7 mg g⁻¹ ids and with 100 mg PCP L⁻¹ the biomass produced was 15.3 mg g⁻¹ ids. PCP degradation found was 83 % in cultures with 50 mg PCP L⁻¹ and with 100 mg PCP L⁻¹ degradation was 91 % at 72 h. The results obtained in this work indicate that growth is higher at high PCP initial concentration due to the fact that toxic is degraded rapidly and the intermediaries produced can be used as carbon source by *A. rouxii*.

It was shown that *A. rouxii* presented higher specific degradation rate with tyrosine and high PCP concentration, maybe because the tyrosinase is induced by both tyrosine and PCP present in culture medium.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	x
ÍDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ABREVIATURAS	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CLOROFENOLES	3
1.2 PROPIEDADES DEL PENTACLOROFENOL (PCF)	3
1.2.1 Propiedades físico-químicas del PCF	3
1.2.2 Características ambientales	4
1.2.2.1 Movilidad y persistencia	4
1.2.2.2 Efectos del PCF en el ambiente	5
1.2.2.3 Toxicidad	6
1.2.2.3.1 Efectos tóxicos en humanos	6
1.2.3 Metabolismo del PCF	7
1.3 ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS	7
1.3.1 Biodegradación	8
1.3.1.1 Biodegradación de PCF con bacterias	9
1.3.1.2 Biodegradación de PCF con hongos	11
1.3.1.3. Papel de las enzimas en la degradación del PCF	12
1.3.1.3.1. Peroxidasas	13
1.3.1.3.1.1. Manganese peroxidasa (MnP)	13
1.3.1.3.1.2. Lignina peroxidasa (LiP)	14

1.3.1.3.2. Fenoloxidasas	14
1.3.1.3.2.1. Lacasas (Lac)	15
1.3.1.3.2.2. Tirosinasa (Tyr)	15
1.3.2 Prospectos para la eliminación de compuestos tóxicos	16
1.3.2.1. Aspectos generales de la fermentación sólida	17
1.3.2.2. Aplicaciones de SFS	18
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. ANTECEDENTES	22
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
5.1 OBJETIVO GENERAL	24
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 MICROORGANISMO	25
6.2 MEDIOS DE CULTIVO	25
6.2.1 Conservación de la cepa	25
6.2.2 Esporulación	25
6.2.3 Medio de cultivo	26
6.2.4 Medio empleado para la fermentación sólida	26
6.3 SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA	27
6.3.1 Soporte sólido	27
6.3.1.1 Pretratamiento del soporte sólido	27

6.3.2 Preparación del cultivo sólido	27
6.3.2.1 Empaquetamiento de columnas	28
6.4 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>A. rouxii</i> Y LA DEGRADACIÓN	29
6.4.1 Efecto de la tirosina en la degradación de PCF	29
6.4.2 Efecto de la concentración inicial del PCF	30
6.4.3 Efecto de la aireación	31
6.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS	32
6.5.1 Medición de pH	32
6.5.2 Estimación de la humedad	32
6.5.3 Estimación de la biomasa	32
6.5.3.1 Determinación de glucosamina como indicador de crecimiento	32
6.5.3.2 Cinética de crecimiento de <i>A. rouxii</i> en cultivo líquido	33
6.5.4 Extracción del PCF	34
6.5.5 Determinación y cuantificación de PCF	34
VII. RESULTADOS	36
7.1 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SÓLIDO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>A. rouxii</i>	36
7.1.1 Influencia de tamaño de inóculo	36
7.1.2 Influencia del soporte, bagazo y bagacillo de caña, en el crecimiento de <i>A. rouxii</i>	36

7.1.3 Efecto de la composición del medio de cultivo	38
7.1.4 Efecto de la humedad inicial	40
7.2 ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE PCF EN CULTIVO SÓLIDO	
POR <i>A. rouxii</i>	43
7.3 EFECTO DE LA ADICIÓN DE TIROSINA EN LA DEGRADACIÓN	
DE PCF	45
7.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PCF EN SU	
DEGRADACIÓN	49
7.5 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA DEGRADACIÓN	
DE PCF CON <i>A. rouxii</i>	53
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del PCF.	4
Tabla 2. Experimento planteado para la degradación de PCF con diferentes concentraciones de tirosina y 12.5 mg PCF L ⁻¹ .	30
Tabla 3. Experimento propuesto para la degradación de pentaclorofenol con cuatro concentraciones iniciales en tres tiempos.	31
Tabla 4. Condiciones seleccionadas para el crecimiento de <i>A. rouxii</i> en fermentación sólida.	42
Tabla 5. Degradación de PCF en cultivos sólidos empleando medio Melin-Norkrans normal y modificado.	43
Tabla 6. Biomasa producida en cultivos sólidos con <i>A. rouxii</i> , con y sin PCF.	44
Tabla 7. Tasa de degradación específica de PCF por <i>A. rouxii</i> en medio M-N normal y modificado.	45
Tabla 8. Tasas de degradación específicas obtenidas a las 72 h de cultivo con <i>A. rouxii</i> empleando diferentes concentraciones de tirosina.	49
Tabla 9. Producción de CO ₂ por <i>A. rouxii</i> con diferentes concentraciones de PCF.	51
Tabla 10. Tasas de degradación específicas con diferentes concentraciones de PCF.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eliminación natural de compuestos tóxicos.	8
Figura 2. Ruta de degradación de PCF propuesta para <i>Sphingomonas sp.</i> (modificado de Cassidy, 1999). (1) Pentaclorofenol; (2) Tetraclorohidroquinona; (3) Triclorohidroquinona; (4) Diclorohidroquinona; (5) 6-clorohidroxiquinol.	10
Figura 3. Vía propuesta para la degradación de pentaclorofenol por basidiomicetos. (modificado de Milliken <i>et al.</i> , 2003). (1) Pentaclorofenol; (2) Tetraclorohidroquinona; (3) Triclorohidroquinona; (4) Diclorohidroquinona	12
Figura 4. Esquema general de la fermentación sólida para el crecimiento de <i>A. rouxii</i> .	28
Figura 5. Comportamiento de humedad y pH en cultivo sólido con <i>A. rouxii</i> .	37
Figura 6. Determinación del crecimiento de <i>A. rouxii</i> , por medio de glucosamina, en cultivo sólido empleando como soportes, bagazo y bagacillo.	38
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>A. rouxii</i> en SFS, con bagazo de caña como soporte impregnado con medio M-N normal y modificado.	39
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>A. rouxii</i> en SFS, con bagazo impregnado con medio modificado y tres humedades iniciales. Promedio de 3 valores, la desviación estándar de 0.47 para la humedad de 80% en 96 h.	41
Figura 9. Comportamiento de la humedad.	42
Figura 10. Comportamiento del pH.	42
Figura 11. Cinética de degradación de <i>A. rouxii</i> en SFS, con bagazo impregnado con medio M-N modificado, 80% de humedad y diferentes concentraciones de tirosina.	46

Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>A. rouxii</i> en SFS, con bagazo impregnado con medio M-N modificado, 80% de humedad y diferentes concentraciones de tirosina.	48
Figura 13. Cinética de crecimiento (A) y degradación (B) de PCF por <i>A. rouxii</i> en cultivos sólidos, en medio modificado, 80% de humedad inicial y adicionado con 0.25 g tirosina L ⁻¹ . (símbolos negros indican degradación, símbolos blancos, biomasa).	50
Figura 14. Crecimiento de <i>A. rouxii</i> y degradación de PCF en cultivo sólido con diferentes tasas de aireación.	53
Figura 15. Crecimiento de <i>A. rouxii</i> y determinación de glucosamina en cultivo líquido. Círculos blancos indican biomasa y círculos negros glucosamina.	69
Figura 16. Determinación de glucosamina en fermentación líquida por mg de micelio de <i>A. rouxii</i> .	71

ABREVIATURAS

a:	nivel de significancia
(2x):	medio Melin-Norkrans Doblemente concentrado
mg:	microgramos
ml:	microlitros
C/N:	relación carbono/nitrógeno
CO₂:	Bióxido de carbono
g msi:	gramos de material seca inicial
g:	gramos
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
h:	horas
L:	litros
Lac:	Lacasa
lb/pulg²:	libras por pulgada cuadrada
LiP:	Lignino Peroxidasa
mg:	miligramos
min:	minutos
ml:	mililitros
M-N:	medio Melin-Norkrans
MnP:	Manganeso Peroxidasa
PCF:	Pentaclorofenol
PDA:	Agar Dextrosa Papa
SFS:	Sistema de Fermentación Sólida
Tir:	Tirosina
Tyr:	Tirosinasa

I. INTRODUCCIÓN

La presencia de compuestos aromáticos como el pentaclorofenol (PCF) en el ambiente hace necesario el desarrollo de tecnologías que permitan eliminarlo (Nicell *et al.*, 1993). Algunos métodos convencionales como adsorción con carbón activado y oxidación química han tenido éxito, aunque con ciertos inconvenientes como una eliminación incompleta, formación de subproductos de mayor toxicidad ó aplicación restringida para algunos compuestos (Kadhim, 1999), pero sobre todo los altos costos que representan estos procesos de eliminación.

La aplicación de algunos microorganismos para la remoción de una gran variedad de compuestos tóxicos (de origen natural y sintéticos) ha despertado un gran interés en el ramo de la biotecnología ambiental. Este proceso mejor conocido como biodegradación permite que algunos microorganismos degraden dichos compuestos ya sea involucrando rutas bioquímicas secundarias o bien empleándolos como única fuente de carbono y energía (Turco *et al.*, 2003; Commandeur, 1991; Singh *et al.*, 1999).

En años recientes, el uso de hongos en la biotecnología ha demostrado un papel importante en la eliminación de residuos peligrosos y biorremediación de suelos. Principalmente los hongos de pudrición blanca degradadores de la madera (Scott, 2003; Rabinovich, 2004). Varias especies de basidiomicetos tanto los de pudrición blanca y café tienen la habilidad de degradar una gran variedad de contaminantes ambientales como hidrocarburos, colorantes tipo azo, nitrotoluenos, bifenilos policlorados y clorofenoles como el pentaclorofenol (PCF) (Aitken, 1993; Nicell, 1993); como ejemplo de hongos de pudrición café se pueden mencionar: *Tyromyces palustris*, *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, y de pudrición blanca *Bjerkandera sp.*, *Phlebia radiata*, *Ceriporiopsis subvermispora*

Pleurotus eryngii, *P. ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*, el cual ha sido de los más estudiados (Bumpus, 1993; Rabinovich *et al.* 2004; Eriksson *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 1997; Scoot *et al.*, 2003).

Los basidiomicetos son capaces de oxidar y degradar *in vitro* un amplio rango de xenobióticos, debido a la presencia de enzimas extracelulares (peroxidasas) producidas por los hongos (Boommithan *et al.*, 1992; Hammel, 1992). Entre las enzimas más importantes reportadas para estos procesos se encuentran las peroxidasas como la Lignino y Manganese peroxidasa (LiP y MnP) reportadas desde 1983 y las lacasas, formando parte principal del sistema enzimático de *P. chrysosporium* (Hammel, 1992; Aitken e Irvine, 1989; Bhasker y Gold, 2000; Cameron *et al.*, 2000).

La habilidad para degradar xenobióticos no se ha limitado tan solo a los basidiomicetos, también se han encontrado otros hongos como los ascomicetos y zigomicetos que son capaces de degradar esos compuestos en altas concentraciones, por mencionar algunos se encuentran los del genero *Fusarium*, *Candida*, *Agaricus* y *Rhizopus* (Lamar, 1992; Chivukula *et al.* 1995, Nagarathama y Bajpai, 1999; Tomasini, 2001).

Estos hongos presentan ventajas sobre los basidiomicetos, como son crecimiento rápido y sistemas enzimáticos diferentes. Por ejemplo se ha demostrado que *Amylomyces rouxii*, un zigomiceto, es capaz de degradar PCF en cultivo líquido gracias a una tirosinasa extracelular producida por este hongo (Montiel *et al.*, 2004). La tirosinasa tiene ventajas sobre las peroxidasas, ya que no requiere de H₂O₂ y su periodo de estabilidad es mayor.

También se ha demostrado que *A. rouxii* es capaz de degradar pentaclorofenol en fermentación en estado sólida, sin embargo el crecimiento en este sistema fue muy pobre.

En este trabajo se pretende aumentar el crecimiento de *A. rouxii* en fermentación en estado sólido y saber si el crecimiento aumenta también la degradación de PCF.

1.1 CLOROFENOLES

Los clorofenoles son un grupo de compuestos contaminantes encontrados en el aire, suelo, agua y ambientes marinos. Este tipo de compuestos también se encuentran como productos secundarios en las aguas de desecho de diversos efluentes industriales, como el efluente del blanqueo de la pulpa en el proceso de fabricación de papel. Además son ampliamente usados en actividades agrícolas como insecticidas, plaguicidas, herbicidas. Las propiedades físico-químicas que presentan hacen que su persistencia en el ambiente sea durante más tiempo y por ende su eliminación aún más difícil debido a su síntesis química. De los principales compuestos clorofenólicos se pueden mencionar al 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol, vinilos clorados y al pentaclorofenol (Roy, 1997; Fahr *et al.*, 1999).

1.2 PROPIEDADES DEL PENTACLOROFENOL (PCF)

1.2.1. Propiedades físico-químicas

Estructura química del PCF:

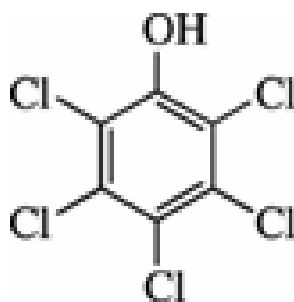


Tabla 1. Propiedades físico-químicas del PCF

NÚMERO DE CAS	87-86-5
Nombres comerciales	Penta, penclorol, Clorofén, Santofén
Formula molecular	C ₆ HCL ₅ O
Peso molecular	266.33
Color y forma	El pentaclorofenol puro forma cristales monoclinicos puros y de calidad técnica se presenta en formas de perlas/polvo de color gris oscuro y pardo.
Densidad	1.978 en 22°
Solubilidad	En agua 2 g L ⁻¹ pH 5 a 20° C En solventes orgánicos (g / 100 g) en 25° C Acetona: 50 Benceno: 15 Etanol (95 %): 120 Metanol: 180 Isopropanol: 85
Punto de fusión	190 - 191° C
Punto de ebullición	309 - 310° C (descomposición)
Presión de vapor	16,000 mPa a 20° C

(Jan, 1998)

1.2.2. Características ambientales

1.2.2.1. Movilidad y persistencia

El PCF puede pasar por lixiviación de la madera tratada al suelo, pero su movilidad depende del tipo del suelo; a medida que aumenta el pH del suelo disminuye su absorción. Es probable que el PCF en la atmósfera se fotolice en ausencia de agua, aunque no se conoce bien el mecanismo. En el agua su persistencia puede ser de hasta 191 días; la luz y la actividad microbiana potencian la degradación. La concentración de este compuesto en el suelo disminuye lentamente al ser también lenta la biodegradación en presencia de algunos

microorganismos y la lixiviación del suelo, variando la vida media de este entre 2 y 4 semanas (Jan, 1998; Irwin, 1997).

1.2.2.2. Efectos del PCF en el ambiente

El uso excesivo e inadecuado del PCF para combatir diversas especies de plagas pueden afectar a muchos organismos que no son el blanco de acción, en la que se incluyen poblaciones microbianas que son habitantes naturales de los suelos y cuya eliminación pueden alterar los ciclos biogeoquímicos naturales. El PCF reduce enormemente el crecimiento de muchas bacterias y hongos, inhibiendo así la producción de bióxido de carbono, consumo de oxígeno y la fijación de nitrógeno (Ishizawa, 1961; Tam y Trevors, 1981).

Cuando el PCF llega a los mantos acuíferos es rápidamente absorbido por los sedimentos en suspensión, plancton, algas invertebrados acuáticos y peces, debido a que el PCF es poco soluble en agua, se solubiliza fácilmente en las grasas de los organismos o sedimentos. En el aire se encuentra por volatilidad, el cual se incrementa considerablemente con el aumento de la temperatura durante el tratamiento de la madera. Su persistencia en el suelo va a depender de sus propiedades de adsorción-desorción. El PCF se une fuertemente a las partículas del suelo y no es fácilmente removido por el agua de la lluvia. Estas formas de retención y de contaminación en el ambiente llegan a provocar una gran cantidad de daños a diversas especies, teniendo incluso efectos nocivos en los humanos (WHO, 1987; Irwin, 1997).

1.2.2.3. Toxicidad

Debido a las impurezas que presenta el PCF técnico (clorodibenzo-p-dioxinas, clorodibenzofuranos e hidroxiclorofenilatos) hace que este compuesto sea de mayor toxicidad y peligro.

Su mecanismo principal de acción en las células es mediante el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, además, de perturbar las propiedades de la membrana (Anandarajah *et al.*, 2000).

Como resultado de experimentos con animales de laboratorio, se ha informado que el PCF también tiene efectos fetotóxicos y embriotóxicos, debido a que se une a varios receptores hormonales.

1.2.2.3.1. Efectos tóxicos en humanos

Uno de sus efectos más comunes es la irritación de ojos, nariz y garganta. En exposición accidental se ha demostrado que el PCF es absorbido por la piel, e inhalado en cuyo caso afecta tracto gastrointestinal y pulmones. Una gran fracción del PCF es fijado a las proteínas de la sangre, lo cual permite su rápida distribución a otros tejidos del cuerpo incluyendo riñones, corazón y glándulas suprarrenales. En exposición con la piel conduce a dermatitis por contacto directo, muchos de estos casos son los reportados por muchos trabajadores, exfoliación en las manos, urticaria y angioedema. También provoca envenenamiento severo e incluso la muerte como resultado de una exposición intensa e inhalación. Los indicadores del envenenamiento agudo son la hipertermia, temblor, problemas de respiración y constricción del pecho. La persona también podría quejarse de dolor

abdominal y exhibir síntomas de vómito, inquietud y confusión mental, transpiración excesiva, debilidad, mareo y sed intensa (WHO, 1987; Irwin, 1997; Kalman, 1986).

1.2.3 Metabolismo del PCF

El metabolismo del PCF en los mamíferos es generalmente similar. En roedores, más del 40% es excretado por orina. El resto es excretado como tetraclorohidroquinona y conjugados glucorínicos. Algunos de los intermediarios encontrados durante el metabolismo en animales y personas son principalmente tetraclorobenzoquinonas y triclorofenoles, también pentaclorofenilacetatos, pentacloroanisoles y pentaclorofenilsulfatos. Se considera que la biotransformación se realiza mediante declorinaciones hidrolíticas y reductivas. En otras especies depende de reacciones de oxidación y metilación (Irwin, 1997).

1.3 ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS

La eliminación de compuestos tóxicos (sintéticos y naturales) puede darse de forma natural, ya sea por medios abióticos (químicos o físicos), y/o bióticos (por la intervención de microorganismos). La eliminación abiótica de estos compuestos (xenobióticos y recalcitrantes) se puede dar por foto-descomposición, volatilización a la atmósfera, percolación e intercambio suelo y agua. La eliminación biótica se refiere a la transformación de los tóxicos por plantas y microorganismos (aerobios y anaerobios) convirtiéndolos en moléculas más simples como CO₂ (Fig. 1). Una de las principales ventajas de la transformación biótica mediante el empleo de microorganismos es que son mucho más rápidas que las transformaciones abióticas, debido a que estas son lentas a causa de las limitaciones de las reacciones químicas. Aunque cuando

una sustancia es recalcitrante, como los compuestos organoclorados, esta eliminación es más lenta y pueden llevar años, al igual que los procesos abióticos (D' Angello, 2003).



Figura 1. Eliminación natural de compuestos tóxicos.

1.3.1. Biodegradación

La gran variedad de especies microbianas del suelo y ambientes acuáticos permiten transformar diversos compuestos tóxicos que se acumulan en el ambiente, utilizándolos como su propia fuente de carbono y energía. Las cepas nativas del suelo degradan a estos contaminantes por diferentes procesos, pero principalmente por mecanismos de dehalogenación hidrolítica, reductiva (anaeróbica) y oxidativa.

La biodegradación describe el proceso de la simplificación parcial o destrucción completa de una variedad de compuestos químicos llevadas a cabo por reacciones enzimáticas de los microorganismos, utilizando dichas estructuras químicas como fuente de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo) y energía (ATP), obteniéndose de estos compuestos productos finales como bióxido de carbono, H₂O e iones inorgánicos (Prince, 2003; Alexander, 1999; Madsen, 1998; Dua, 2002).

El término biorremediación ha sido usado para describir el proceso para degradar o remover compuestos peligrosos presentes en suelos y aguas contaminadas, mediante el uso de microorganismos (Glazer y Nikaido, 1995). La degradación y su aplicación en la biorremediación de contaminantes orgánicos ha estimulado estudios bioquímicos y moleculares de procesos microbianos (Lal *et al.*, 1986; Fewson, 1988; Bollag, 1992; Johri *et al.*, 1996). La biotransformación de contaminantes orgánicos ha sido extensamente estudiado para entender la ecología microbiana, fisiología y la evolución, para su potencial en la biorremediación. (Bouwer y Zhender, 1993, Chen *et al.*, 1999; Johan *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2001; Watanabe, 2001). La biodegradación depende de tres factores principales: las condiciones ambientales, el tipo y la concentración de los contaminantes y los microorganismos responsables (Madsen, 2003).

La estructura química de los contaminantes (número de carbonos en el anillo, halógenos, arreglo de enlaces), concentración (ngg^{-1} ó gg^{-1}), colocación física (superficie del suelo o en solución), la presencia de electrones donadores o aceptores y las habilidades fisiológicas de los microorganismos, residentes o introducidos, son algunos de los principales factores de control para que se lleve a cabo la biodegradación o biorremediación (Madsen, 2003).

1.3.1.1. Biodegradación de PCF con bacterias

El uso de clorofenoles, como ya se ha mencionado, conduce a la contaminación ambiental tanto de aguas como de suelos. Sin embargo diversos géneros de bacterias han demostrado tener la capacidad de degradar altas concentraciones de numerosos compuestos

tóxicos (Resnick y Chapman, 1994; Karlson *et al.*, 1995; White *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1997, Zablutowics *et al.*, 1998; Lee, 1998).

Por ejemplo, en la degradación de PCF por bacterias como *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* se han observado múltiples mecanismos para la dehalogenación, transformación y el subsiguiente rompimiento del anillo aromático de esos compuestos. (O'Reilly y Crawford, 1989; Nohynek *et al.*, 1996; Pfender *et al.*, 1997; Riegert *et al.*, 1998; Radehaus, 1992). En la figura 2 Se muestra la ruta de degradación de PCF por *Sphingomonas sp.* (Cassidy, 1999).

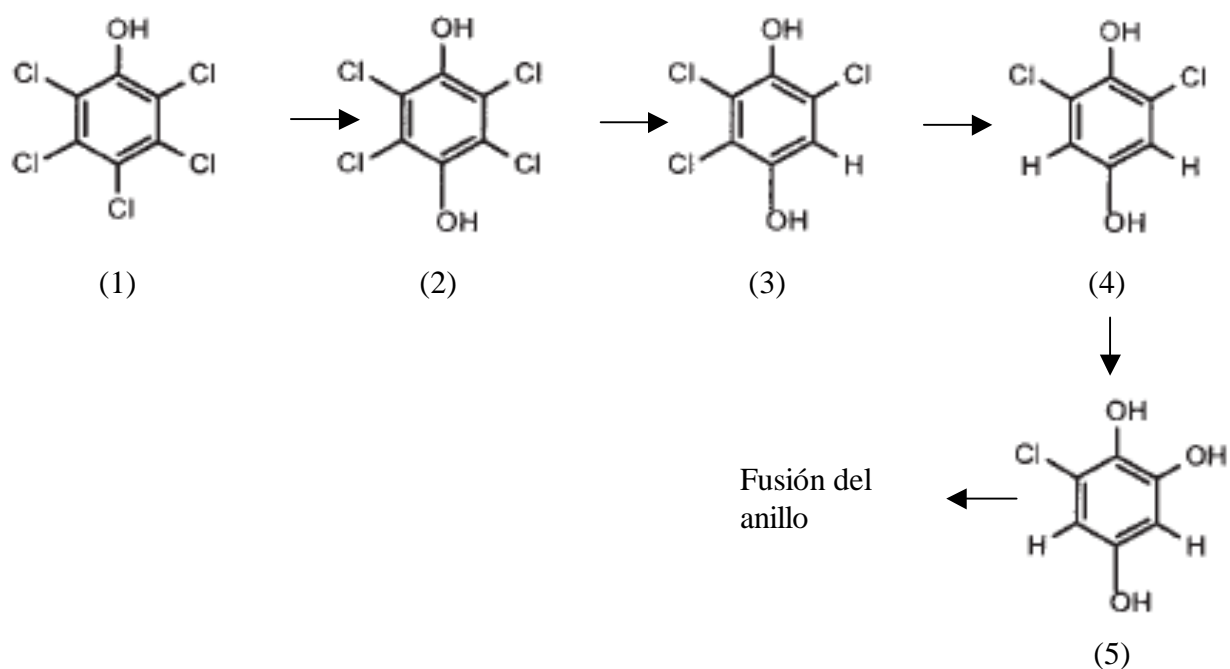


Figura 2. Ruta de degradación de PCF propuesta para *Sphingomonas sp.* (modificado de Cassidy, 1999). (1) Pentaclorofenol; (2) Tetraclorohidroquinona; (3) Triclorohidroquinona; (4) Diclorohidroquinona; (5) 6-clorohidroxiquinol.

1.3.1.2. Biodegradación de PCF con hongos

Las décadas pasadas se han caracterizado por el incremento en estudios de eliminación de diversos compuestos aromáticos naturales y sintéticos (plaguicidas, halo- aromáticos, compuestos policíclicos aromáticos, bifenilos clorados, dioxinas, entre otros). Los microorganismos capaces de detoxificar esos contaminantes bajo condiciones naturales son de particular interés (Reedy, 1995; Szewczyk *et al.*, 2003). En años recientes, la atención se ha enfocado al papel de los hongos en la degradación de xenobióticos aromáticos, aunque el mecanismo de transformación de estos compuestos no es muy claro para muchos casos (Hiratsuka *et al.*, 2005; Paszezynski, 1995; McAllister, 1996).

Los hongos de pudrición blanca son un grupo que pertenecen a la clase de los basidiomicetos, y tienen la habilidad de degradar compuestos naturales como la hemicelulosa, celulosa y lignina, así como una gran cantidad de compuestos organohalogenados (Pointing, 2001; Jong y Field, 1997; Bumpus *et al.*, 1985). Algunos de estos hongos son: *Phanerochaete chrysosporium*, *P. sordida*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata* y *Trametes versicolor* (Zeddel *et al.*, 1993. Hiratsuka *et al.*, 2005; Eriksson *et al.* 1990; Moreira *et al.* 1997; Scott, 2003).

El resultado de numerosas investigaciones con diferentes hongos (basidiomicetos) como *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus*, *Phenillus badius* y *P. chrysosporium* han demostrado la habilidad de mineralizar un gran número de organoclorados como el PCF (Alleman *et al.*, 1992; Mileski *et al.*, 1988; Okeke *et al.*, 1996; Okeke *et al.*, 1997; Steiman *et al.*, 1994), e incluso describiéndose posibles rutas alternativas de la degradación del PCF (Fig. 3). La habilidad para degradar xenobióticos no está limitado solo para los basidiomicetos, también se han encontrado otros hongos como los zigomicetos que han demostrado tener capacidad de

degradar ciertos compuestos peligrosos. Por ejemplo, se ha usado *Rhizopus arrhizus* para el tratamiento de uranio, *Rhizopus oryzae* para la remoción de clorofenoles presentes en efluentes de la industria del papel, y *Amylomyces rouxii* para la eliminación de PCF (Nagarathama y Bajpai, 1992; Montiel *et al.*, 2004).

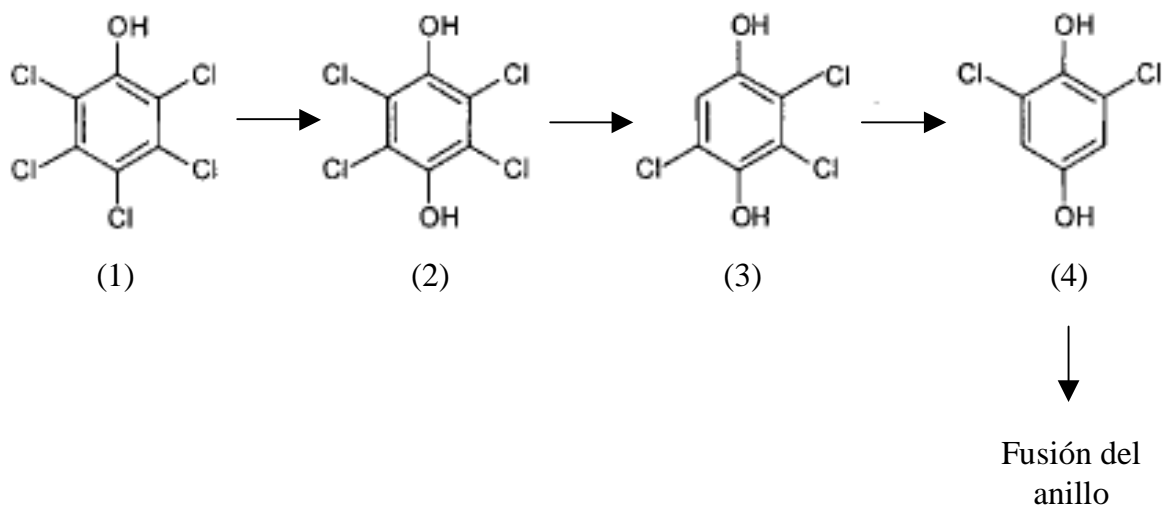


Figura 3. Vía propuesta para la degradación de pentaclorofenol por basidiomicetos (modificado de Milliken *et al.*, 2003). (1) Pentaclorofenol; (2) Tetraclorohidroquinona; (3) Triclorohidroquinona; (4) Diclorohidroquinona.

1.3.1.3. Papel de las enzimas en la degradación del PCF

La biodegradación y mineralización de compuestos orgánicos naturales y artificiales, por bacterias y hongos se lleva a cabo por reacciones enzimáticas principalmente de oxidoreducción.

Estas enzimas pueden emplearse también en el proceso de remediación como tratamiento de contaminantes específicos, como el PCF, al mostrar una mejor eficiencia y estabilidad ante otros métodos (Karma y Nicell, 1997).

Las principales enzimas producidas por hongos (de pudrición blanca y café) que intervienen en la degradación del PCF, son las peroxidasas y las fenoloxidasas (Duran y Esposito, 2000).

1.3.1.3.1. Peroxidasas

Son oxidoreductasas producidas por un gran número de microorganismos y plantas. Catalizan una gran variedad de reacciones pero todas ellas requieren de la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), para su activación. El H_2O_2 primero oxida a la enzima para después oxidar el sustrato en turno. Las peroxidasas (principalmente LiP y MnP) han sido usadas en laboratorios para el tratamiento de contaminantes aromáticos (Karma y Nicell, 1997).

1.3.1.3.1.1. Manganeso peroxidasa (MnP) (E.C.1.11.13)

Es una hemoproteína glucosilada extracelular que cataliza la oxidación de Mn(II) a Mn(III) dependiente de H_2O_2 . (Kirt y Farrell, 1987; Gold y Alic, 1993; Cullen y Kersten, 1992). El compuesto Mn(III) resultante participa en la oxidación de sustratos orgánicos. La enzima requiere de altas concentraciones de Mn(III) para facilitar el tratamiento de aguas de desecho (Aitken *et al.*, 1993). Esta enzima también es producida por *P. chrysosporium* y se ha observado que cataliza la oxidación de varios compuestos aromáticos, aunque esta reacción depende de la presencia de manganeso divalente y ciertas soluciones amortiguadoras (Aitken e

Irvine, 1989). En forma libre hay registros de que esta enzima actúa sobre fenoles y colorantes aromáticos. (Aitken *et al.*, 1993; Wariishi, 1992; Palma *et al.*, 1999).

1.3.1.3.1.2. Lignina peroxidasa (LiP) (E.C. 1.11.14)

Las ligninas peroxidadas son también hemoproteínas glucosiladas extracelulares que catalizan la oxidación de un electrón dependiente de H₂O₂, de una variedad de estructuras aromáticas relacionadas con la lignina, resultando la formación de cationes radicales arilos los cuales experimentan varias reacciones no enzimáticas y producen gran variedad de productos finales (Kirt y Farrell, 1987; Higuchi, 1993; Rodriguez *et al.*, 1997). Estas enzimas son altamente inespecíficas lo cual posibilita la oxidación de una gran diversidad de compuestos xenobióticos que tienen algunas estructuras similares a las subestructuras de la lignina (Hammel, 1989; Al-kassim *et al.*, 1994)

Forman parte también del sistema enzimático de *P. chrysosporium* y de algunos ascomicetos (Aitken *et al.* 1993; Aitken e Irvine, 1989; Venkatadri e Irvine, 1993). Varios autores reportan que la LiP es fácilmente inactivada en pH bajos. La estabilidad de la enzima se ve mejorada al incrementar el pH, su concentración ó incubando la enzima en la presencia de un sustrato específico como el alcohol veratrílico. También se encontró que las condiciones óptimas para la remoción de fenoles incluyen altas concentraciones de enzima, pH mayor de 4.0 y la adición controlada de H₂O₂ (Aitken e Irvine, 1989).

1.3.1.3.2. Fenoloxidasas

Las fenoloxidasas representan otra familia de oxido-reductasas que catalizan reacciones de oxidación de compuestos fenólicos (Durán y Esposito, 2002; Husain, 2000). Se

conocen dos clases de fenoloxidasas: tirosinasas y lacasas. Estos dos tipos de enzimas requieren de la presencia de oxígeno molecular para su actividad, pero no de cofactores (Jolivet *et al.*, 1998; Steffens *et al.*, 1998; Chevalier *et al.*, 1999; Bollag, 1992; Burton, 1994).

1.3.1.3.2.1. Lacasas (Lac) (E.C. 1.10.3.2)

La lacasa pertenece a un pequeño grupo de enzimas denominadas oxidasas azules (Karma y Nicell, 1997). En general esta enzima contiene cuatro átomos de cobre, los cuales juegan un papel importante en su mecanismo catalítico. Los átomos de cobre son distribuidos en diferentes sitios y son clasificados en tres tipos, de acuerdo a su especificidad espectroscópica y características funcionales (Durán *et al.*, 2002; Thurston, 1994; Minussi *et al.*, 1999).

La lacasa de los hongos tiene un papel importante también en la delignificación, ya que puede degradar lignina en ausencia de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa (Mayer, 2002). Esta enzima es capaz de catalizar varios compuestos aromáticos (particularmente fenoles) (Ricotta, 1996). Hongos de pudrición blanca como *Panus tirinus* y *Coriolus versicolor* demostraron degradar 2,4,6-triclorofenol en cultivos líquidos, en ambos casos al purificar las enzimas se demostró que la reacción se llevó a cabo por lacasa. (Leontievsky *et al.*, 2000; Gianfreda, 1999).

1.3.1.3.2.2. Tirosinasa (Tyr) (E.C. 1.14.18.1)

La tirosinasa (monofenol monooxigenasa) se caracteriza por catalizar la *orto*-hidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y la subsiguiente oxidación de difenoles a quinonas (actividad difenolasa o catecolasa). La reacción es de forma

natural, para bacterias, hongos, plantas y mamíferos. La tirosinasa contiene un centro binuclear con tres tipos de cobres, en los cuales 2 iones de cobre están estrechamente espaciados y coordinados para 3 histidinas a través de los átomos nitrógeno. Este tipo de sitio ha sido encontrado y caracterizado estructuralmente también en hemocianinas, los cuales actúan como acarreadores de oxígeno en artrópodos y moluscos y en la catecol oxidasa, las cuales llevan a cabo la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (Solomon *et al.*, 1996; Riley 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 1995).

En estudios realizados con tirosinasa se encontró que también puede eliminar compuestos xenobióticos. *Streptomyces antibioticus* es un microorganismo que produce tirosinasa y tiene la capacidad de degradar fluoro-fenoles. Se pueden eliminar otros contaminantes de estructura parecida por la acción de dicha enzima. Es decir, la tirosinasa también es una enzima que puede contribuir a la limpieza de suelos y tratamiento de aguas residuales (Battaini *et al.*, 2002; Key *et al.*, 1997; Ikehata y Nicell, 2000, Montiel *et al.*, 2004, Tomsovský y Homolka, 2004).

1.3.2 Prospectos para la eliminación de compuestos tóxicos

Los procesos de fermentación pueden ocurrir en medios líquidos y sólidos. La principal diferencia entre estos dos bio-procesos es la cantidad de agua libre en el sustrato. El sistema de fermentación sólida (SFS) involucra el crecimiento de microorganismos en partículas sólidas en la ausencia o casi ausencia de agua libre (Mitchell *et al.*, 2000).

Los diversos avances en la biotecnología mediante procesos fermentativos (líquidos y sólidos) han permitido diseñar experimentos con microorganismos capaces de degradar

clorofenoles *in vitro*, al encontrar las condiciones para su tolerancia y eliminación de dichos compuestos, como medios definidos, aireación, pH y temperatura, entre otros factores.

Las fermentaciones líquidas y sólidas se han propuesto como procesos alternativos para la eliminación de compuestos aromáticos como el PCF. Estudios realizados con diferentes hongos como *Coriolus versicolor*, *Amylomyces rouxii*, mostraron que la degradación de PCF en fermentación sólida es mayor que en líquida. Razón por la cual la fermentación sólida se puede proponer como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados (Ulla *et al.*, 2000; Montiel *et al.*, 2004).

1.3.2.1. Aspectos generales de la fermentación sólida

Son varios los aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de algunos bioprocesos en fermentación en estado sólido (SFS), como la selección adecuada del sustrato y del microorganismo, optimización de parámetros del proceso, así como el aislamiento y purificación de productos. Partiendo por la clasificación teórica basada por la actividad del agua, principalmente los hongos y levaduras son capaces de desarrollarse en estos sistemas, sin embargo algunos estudios han demostrado también que las bacterias pueden ser manejadas y manipuladas para estos procesos (Pandey, 1992; Pandey *et al.*, 2000; Nampoothiri y Pandey, 1996; Selvakumar y Pandey, 1999).

Generalmente se ha demostrado que la producción de metabolitos de interés es más alta en SFS en comparación a SFL. Esto puede deberse a que los cultivos sólidos se asemejan más al hábitat natural del hongo (Pandey *et al.*, 2000; Pandey, 2003).

La selección de un sustrato apropiado es uno de los aspectos más importantes. Los materiales sólidos son no solubles y actúan como soporte físico e incluso como fuente de

nutrientes. Dichos materiales pueden ser sustratos naturales como residuos agroindustriales (cáscara de trigo, salvado de trigo, bagazo de caña) o soportes inertes como poliuretano (Pandey, 1992; Pandey *et al.*, 2000; Pandey y Soccol, 2000; Peralta-Perez, 2001; Hoogschangen *et al.*, 2001; Gallert, 2000). Se pueden distinguir dos tipos de SFS en función de la naturaleza de la fase sólida empleada:

- 1) Cultivo sólido con una fase sustrato soporte. En este sistema la fase sólida esta constituida de un material que asume simultáneamente la función de soporte y fuente de nutrientes (Barrios, 1994).
- 2) Cultivo sólido con un soporte impregnado de un medio líquido: en este tipo de fermentación, la fase sólida está constituida por un soporte inerte que su única función es como soporte físico y se requiere de una solución nutritiva (Barrios *et al.*, 1988).

Otros parámetros importantes en los procesos de fermentación sólida son tamaño de partícula, humedad inicial, pre-tratamiento del sustrato, aireación, tamaño de inóculo, suplemento de fuente de carbono e inductores, así como de otros nutrientes como N, P y elementos trazas (Pandey, 2003; Hoogschangen *et al.*, 2001).

1.3.2.2. Aplicaciones de SFS

El uso de la fermentación sólida en los últimos años se ha enfocado principalmente a procesos de biodegradación de compuestos aromáticos tóxicos, detoxificación biológica de residuos agroindustriales, biotransformación y producción de metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, alcaloides, hormonas de crecimiento vegetal, enzimas, ácidos orgánicos, aromas (Ulla *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Nigam y

Singh, 1996; Gautam *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2001; Brand *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2000; Barrios *et al.*, 2003).

La fermentación sólida presenta ciertas ventajas y desventajas con respecto a la fermentación líquida (Mundgett, 1986; Barrios, 1994). Entre las ventajas se pueden mencionar:

1. Los contenedores de fermentación pueden ser pequeños debido a que se utiliza poco agua.
2. No se requieren de tanques para medio semilla, ya que se inócula con esporas.
3. La baja humedad reduce los problemas de contaminación.
4. Las condiciones del SFS para el crecimiento de hongos son muy similares a su hábitat natural.
5. La aireación se facilita debido a la porosidad del material.
6. La producción de metabolitos puede ser mucho mayor que en cultivos líquidos.

Algunas de las desventajas en cultivos sólidos son:

1. La adición de agua en fases tempranas de la fermentación puede incrementar los riesgos de contaminación.
2. Se dificulta inocular el medio con micelio.
3. Los parámetros de cultivo como pH no se pueden regular fácilmente.
4. La recuperación del producto deseado de la fermentación se puede dificultar, si éste es absorbido por el soporte.

El estudio de degradación de PCF en fermentación en SFS es importante ya que existen algunas diversas condiciones de cultivo que afectan la capacidad de degradación por los microorganismos y aún no han sido investigadas.

Por otro lado, los hongos no se comportan de igual manera cuando se cultivan en líquido y en sólido. Por ello es importante elucidar el comportamiento de los hongos en SFS, así como determinar la capacidad de degradación de PCF en este sistema.

II. JUSTIFICACIÓN

El pentaclorofenol (PCF) tiene aplicaciones muy variadas, y además es un producto de desecho del proceso de blanqueo de pulpa y papel lo que causa un problema ambiental de gran importancia. Diferentes métodos (físicos y químicos) han sido empleados para la remoción del PCF, sin embargo, la transformación puede ser incompleta e incluso provocar la formación de productos más tóxicos. Otra alternativa para la eliminación de compuestos aromáticos es mediante la biodegradación, en la que participan microorganismos capaces de mineralizarlos en su totalidad, como lo han demostrado los hongos filamentosos.

Por tales razones, el aislamiento y la identificación de nuevas especies de hongos ha despertado gran interés en el ramo de la biotecnología ambiental, ya que muchos de estos microorganismos han sido ampliamente usados para el tratamiento de desechos peligrosos así como para la biorremediación de suelos.

Se ha demostrado que *Amylomyces rouxii* aislado de un efluente industrial, tiene capacidad para metabolizar PCF bajo condiciones controladas en cultivos líquidos, así como en cultivos sólidos aunque fue más eficiente en este último sistema al remover dicho compuesto en un lapso de tiempo más corto. Sin embargo, *A. rouxii* presentó crecimiento pobre ($3.2 \text{ ml CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ msi}$), en cultivo sólido comparado con otros hongos que llegan a producir tasas de CO_2 de 6 a $8 \text{ ml h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ msi}$ (Córtes *et al.*, 2002).

Por ese motivo, es importante determinar en que condiciones se obtiene mayor crecimiento de *A. rouxii* en cultivo sólido, y bajo dichas condiciones estudiar también su capacidad de degradación. Puede ser posible que al lograr un mejor crecimiento del hongo se incremente también su capacidad de degradación.

III. ANTECEDENTES

A partir de efluentes industriales (papelera, tanería y refresquera), en el mismo laboratorio donde se realizó el presente estudio, se aislaron cepas silvestres de hongos capaces de tolerar y degradar PCF en cultivo superficial. La cepa que tolero más PCF (50 ppm) fue identificada, por observaciones microscópicas y micro cultivo, como *Rhizopus nigricans* y posteriormente por técnicas moleculares se identificó como *Amylomyces rouxii* (Tomasini *et al.*, 2001; Montiel *et al.*, 2004). Se demostró que *A. rouxii* tolera dos veces más PCF que *P. chrysosporium* y que su crecimiento es mejor cuando el medio está limitado en nitrógeno (Tomasini *et al.*, 1996).

Estudios hechos con *R. nigricans* demostraron que en concentraciones iniciales de PCF de 12.5 mg L⁻¹ se inhibe la germinación de las esporas en cultivo sumergido. Por lo que se estudió la edad del micelio a la que se adiciona el PCF. Se encontró que ésta tiene un efecto importante sobre la degradación del compuesto; cuando el PCF se adiciona al micelio con 48 h de cultivo se observa una mejor eficiencia, en comparación de los otros tiempos ensayados, 24 y 96 h (Flores, 2000).

Tomasini *et al.* (2001) y Cortés *et al.* (2001) reportaron que en fermentación líquida, la degradación de PCF con *R. nigricans* se ve afectada por factores como relación de C/N, pH y la velocidad de agitación, no así la temperatura. Se observó que, la degradación de PCF en cultivo sumergido por *A. rouxii* fue 65% en un tiempo de 160 h mientras que *P. chrysosporium* lo hace en 144 h ambos con una concentración inicial de 12.5 mg L⁻¹.

Se demostró que en cultivo sumergido *A. rouxii* degrada PCF con mayor eficiencia en presencia de tirosina (posible inductor de la enzima). En cultivos con 0.1 g L⁻¹ de tirosina y con una concentración inicial de PCF de 12.5 mg L⁻¹ se obtuvo el 85% de degradación de

PCF, mientras que en los controles, cultivos sin tirosina, solo se observó el 55% de degradación en 144 h. El efecto de la tirosina es mayor cuando se incrementa la concentración inicial del PCF, ya que en cultivos con 12.5 mg L^{-1} se obtiene un 30% más de degradación que en los controles, mientras que en concentraciones iniciales de 25 mg L^{-1} se degradó un 70% más respecto a los medios controles (Marcial, 2002). También se demostró que *A. rouxii* no produce peroxidasas, (Tomasini *et al.*, 2001) y que una de las enzimas responsables de la degradación de PCF es la tirosinasa (Montiel *et al.*, 2004).

Por otro lado, se encontró que uno de los intermediarios formados, durante el proceso de degradación de PCF por *R. nigricans*, es el tetracloro-*p*-benzoquinona, el cual se presenta en mayor cantidad a las 72 h de cultivo desapareciendo rápidamente, lo cual indicaría el paso a la formación de otros intermediarios (Marcial, 2002).

También se realizaron estudios de degradación por *A. rouxii* en fermentación en estado sólido (FS) y se demostró que *A. rouxii* degrada el 85 % del PCF inicial (12.5 mg L^{-1}) en 96 h (Cortés *et al.*, 2002).

En este tipo de fermentación en estado sólido es difícil cuantificar la biomasa, por lo que la evolución de CO_2 es una medida indirecta del crecimiento. Uno de los problemas presentados en los cultivos sólidos fue el pobre crecimiento de *R. nigricans*, ya que sólo se registraron tasas de producción de CO_2 de $3.5 \text{ ml CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de materia seca en comparación con *P. chrysosporium* y otros tipos de hongos que registraron tasas de hasta 8-10 $\text{ml CO}_2/\text{h g}$ de materia seca (Cortés *et al.* 2002).

IV. HIPÓTESIS

Si se logra mayor crecimiento de *Amilomyces rouxii* en fermentación en estado sólido se incrementará la capacidad de degradación de pentaclorofenol con este hongo.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de cultivo en sistema de fermentación sólida, composición del medio, concentración inicial de PCF y humedad inicial, en que se obtiene mayor degradación de PCF por *A. rouxii*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

§ Determinar las condiciones de cultivo, composición del medio (glucosa, extracto de malta, tirosina), tamaño de inóculo, humedad y aireación para obtener mayor crecimiento de *A. rouxii*.

§ Estudiar el efecto de la concentración inicial de pentaclorofenol en la degradación de este por *A. rouxii*, en fermentación sólida.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MICROORGANISMO

La cepa de *Amylomyces rouxii* empleada para los experimentos se aisló de un efluente de la industria de papel en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario de la UAM-I. El hongo inicialmente fue identificado como *Rhizopus nigricans* (Tomasini *et al.*, 1996; Cortés *et al.*, 2001) mediante observaciones al microscopio y por micro cultivo; posteriormente se identificó por técnicas moleculares como *Amylomyces rouxii* (antes llamado *Rhizopus stolonifer*) mediante la secuencia 18s rDNA (Montiel *et al.* 2004).

6.2 MEDIOS DE CULTIVO

6.2.1 Conservación de la cepa

A. rouxii se cultivó en medio PDA (Agar Dextrosa Papa) en cajas de Petri y se incubó a 30° C durante 24 h. Con un horador se formaron discos de agar con micelio ya crecido, para posteriormente colocarlos en viales de 2 ml, conteniendo una solución de glicerol al 40 % y después congelarlos a -70° C.

6.2.2 Esporulación

Debido a que para cada fermentación se requieren esporas recién obtenidas, para cada experimento se preparó medio PDA en matraces Erlenmeyer los cuales se inocularon con los discos que contenían el micelio de *A. rouxii* conservado a -70° C. Se incubaron de 3-5 días a 30° C hasta su máxima esporulación. Finalmente, se obtuvo la suspensión de esporas con una solución de Tween 80 al 0.1 % y con una barra magnética se desprendieron las esporas del micelio, agitando lentamente alrededor de 8 minutos. El conteo de las esporas se realizó con

una cámara de Neubauer, para obtener la concentración final de esporas deseada para el cultivo.

6.2.3 Medio de cultivo

Se utilizó el medio Melín-Norkrans (M-N) modificado (Ainsworth, 1995; Tomasini *et al.*, 1996). Con una relación C/N de 18.9; la composición es:

Glucosa	10 g L ⁻¹
Extracto de levadura	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.5 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.15 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.5 g L ⁻¹

La preparación para un litro de este medio de cultivo se compone de 50 % de agua destilada y 50 % de un amortiguador de citratos 5.6 (Bernal, 1999)

Dicho amortiguador de citratos se preparó de la siguiente manera:

Acido cítrico monohidratado 0.1 M	137 ml	} Aforar a 1 litro de agua destilada
Citrato de sodio 0.1 M	363 ml	

6.2.4 Medio empleado para la fermentación sólida

Para estos cultivos sólidos se empleó el medio M-N doblemente concentrado (2x), debido a que resultados obtenidos anteriormente con *A. rouxii*, en este sistema, se ha demostrado un mejor desarrollo en esta concentración que en otras más altas (Cortés, 2001).

Se utilizó el medio M-N modificado, aumentando la concentración de glucosa (25 g L^{-1}) y adicionando extracto de malta (2 g L^{-1}). El pH inicial del cultivo se mantuvo igual, 5.6, de acuerdo con los estudios realizados también anteriormente (Bernal, 1999).

6.3 SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA

6.3.1 Soporte sólido

Como materia sólida para estos estudios se empleó bagazo de caña, el cual se obtuvo tamizándolo en mallas de No. 30 y 50; las partículas retenidas en dichas mallas fueron las que se utilizaron para los cultivos.

6.3.1.1 Pretratamiento del soporte sólido

El pretratamiento se realizó mezclando el bagazo de caña tamizado con el 30-50 % de agua total que se utilizaría para el medio de cultivo, aunque esto depende de la humedad inicial con la que se trabaje (Barrios *et al.*, 1988). Se sometió a una presión de 3 lb/pulg^2 (101° C) durante 40 min utilizando un autoclave, e inmediatamente después se esterilizó a 15 lb/pulg^2 y 121° C durante 30 min.

6.3.2 Preparación del cultivo sólido

Se inoculó el medio M-N con las esporas ($1 \times 10^7 \text{ esp ml}^{-1}$) y se le adicionó el PCF, este último si lo requería el experimento. El medio ya inoculado se adicionó al bagazo tratado y se mezcló perfectamente para lograr la mayor homogeneidad posible. Una vez mezclado se procedió al llenado de las columnas.

6.3.2.1 Empaquetamiento de columnas

Se emplearon columnas de vidrio de 15 cm de largo y 2 cm de diámetro, las cuales se empaquetaron con 12 g de soporte sólido con una densidad de empaque de 0.26 g ml^{-1} (Barrios *et al.*, 1988).

Una vez empacadas las columnas con el soporte sólido se les colocó un burbujeador de vidrio con agua destilada, para pasarles aire húmedo a través del medio sólido y no perder la humedad requerida para la fermentación. El flujo de aire utilizado fue de $0.12 \text{ litros de aire g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ u otro, en cuyo caso se indica en cada experimento. Las columnas con los burbujeadores, finalmente se colocaron en un baño de agua a 30° C . El esquema general de la fermentación se muestra en la figura 4.

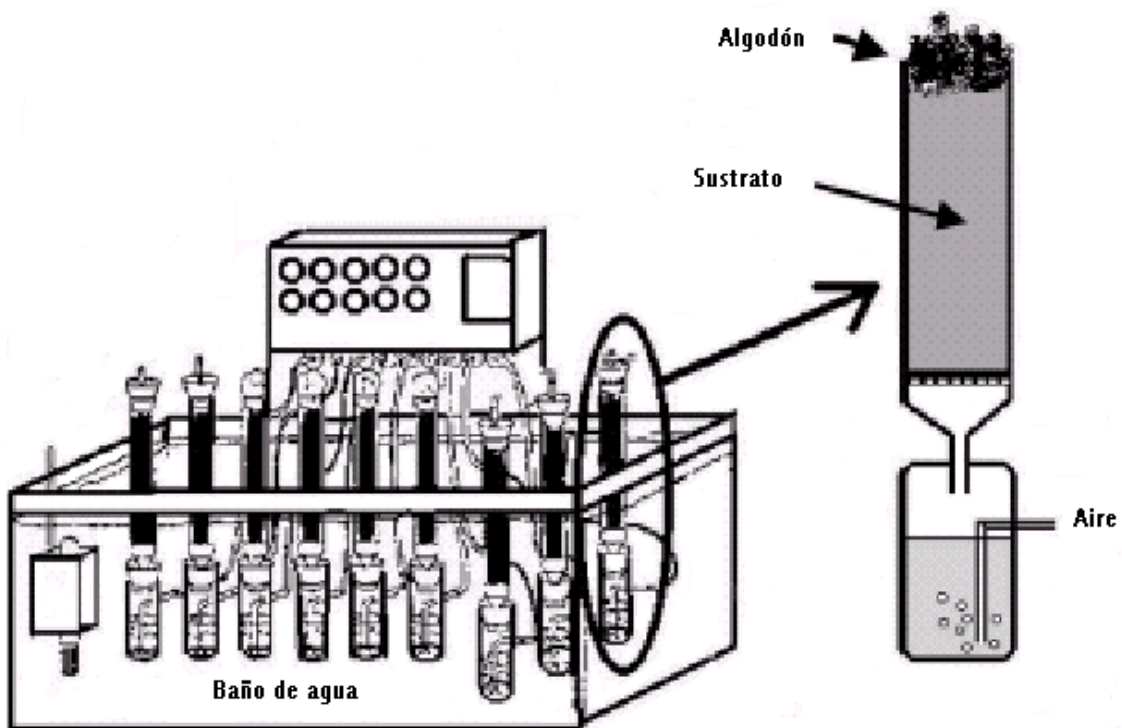


Figura 4. Esquema general de la fermentación sólida para el crecimiento de *A. rouxii*

6.4 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *A. rouxii* Y LA DEGRADACIÓN.

Las condiciones de cultivo estudiadas con el fin de obtener mayor crecimiento de *A. rouxii*, fueron tamaño de inóculo, 1) 1×10^7 y 1×10^8 esporas ml^{-1} , 2) Composición del medio aumentando la cantidad de glucosa y adicionando extracto de malta, 3) Humedad inicial y 4) Aireación. Cada uno de estos parámetros fueron estudiados como experimentos independientes.

Teniendo las condiciones de cultivo para *A. rouxii*, los siguientes experimentos consistieron en estudiar la degradación de PCF. Para ello se estudiaron los medios de cultivos (normal y modificado), con una sola concentración, 12.5 mg L^{-1} , el cual se le adicionó al medio de cultivo desde el inicio, a diferencia de los cultivos líquidos que se le agrega a las 48 h de cultivo (Tomasini *et al.*, 2001), lo cual permitió observar el efecto del medio modificado en la degradación del PCF.

6.4.1 Efecto de la tirosina en la degradación de PCF

Con la finalidad de determinar si la tirosina ejerce efecto sobre la degradación de PCF en cultivo sólido, al igual que en cultivos líquidos (Marcial, 2002; Montiel *et al.*, 2004), en el experimento planteado para dicho estudio (tabla 2), se utilizaron cuatro concentraciones de tirosina, la cual se adicionó en polvo, después de esterilizado el medio de cultivo modificado; una sola concentración de PCF (12.5 mg L^{-1}) y los tiempos de muestreo fueron 72 y 96 h.

Tabla 2. Experimento planteado para la degradación de PCF con diferentes concentraciones de tirosina y 12.5 mg PCF L⁻¹.

Tiempo (h)	Tratamientos
72	Sin tirosina
	0.1 g L ⁻¹
	0.2 g L ⁻¹
	0.25 g L ⁻¹
	0.3 g L ⁻¹
96	Sin tirosina
	0.1 g L ⁻¹
	0.2 g L ⁻¹
	0.25 g L ⁻¹
	0.3 g L ⁻¹

En este experimento se realizaron 6 replicas para cada tratamiento

6.4.2 Efecto de la concentración inicial del PCF

Teniendo establecidas las condiciones de crecimiento de *A. rouxii*, la concentración de tirosina adicionada al medio, 0.25 mg L⁻¹, el siguiente punto a estudiar fue el efecto de la concentración inicial del PCF en la degradación de éste. Los parámetros de respuesta fueron crecimiento, humedad, pH y degradación de PCF. Para ello se realizó el diseño mostrado en la tabla 3.

Tabla 3. Experimento propuesto para la degradación de pentaclorofenol con cuatro concentraciones iniciales en tres tiempos.

Tiempo	PCF inicial
72 h	12.5 mg L ⁻¹
	25 mg L ⁻¹
	50 mg L ⁻¹
	100 mg L ⁻¹
96 h	12.5 mg L ⁻¹
	25 mg L ⁻¹
	50 mg L ⁻¹
	100 mg L ⁻¹
120 h	12.5 mg L ⁻¹
	25 mg L ⁻¹
	50 mg L ⁻¹
	100 mg L ⁻¹

Este experimento se hizo 3 veces por triplicado para cada tiempo

6.4.3 Efecto de la aireación

Se estudió el efecto de la aireación en el crecimiento y degradación de PCF por *A. rouxii* bajo las condiciones seleccionadas anteriormente. Los flujos de aireación estudiados fueron 0.04, 0.12 y 0.16 L aire g⁻¹ h⁻¹. Para este experimento se realizó una cinética de 0 a 120 h, por duplicado cada tiempo.

6.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

6.5.1 Medición de pH

La determinación de este parámetro se realizó tomando 1 g de bagazo fermentado al cual se le adicionaron 10 ml de agua destilada y se agitó durante 5 min con una barra magnética. El pH se midió directamente utilizando un potenciómetro Jenco Electronics.

6.5.2 Estimación de la humedad

El contenido de humedad se obtuvo por diferencia de peso seco, para ello se colocaron 3 g de bagazo de caña fermentado a 80° C en una estufa durante 24 h.

6.5.3 Estimación de la biomasa

1.5.3.1 Determinación de glucosamina como indicador de crecimiento

Se montó la técnica para determinar glucosamina (compuesto que se encuentra en la pared celular de los hongos) que se utiliza como indicador de crecimiento. Para ello se requiere de una hidrólisis ácida para liberar la glucosamina, la cual al combinarse con la acetilacetona forma un compuesto pirrólico, que al reaccionar con el reactivo para-dimetilamino benzaldehído (PDBA) forma un compuesto de color rojo con un máximo de absorbancia de 530 a 550 nm.

El protocolo empleado para la determinación de la glucosamina fue de acuerdo al de Tomaselli *et al.*, (2001), tal y como trabajaron con *Cunnintghamela elegans*, un hongo filamentoso que pertenece a la clase de los zigomicetos. El procedimiento es el siguiente:

- Tomar una muestra de 0.5 g del material sólido cultivado a una temperatura de 60° C durante 48 h

- Adicionar 5 ml de H₂SO₄ (al 72 % v/v) a la muestra seca y mantener en agitación a 25° C durante 30 min.
- Diluir la muestra con 54 ml de agua destilada y colocarlas en el autoclave durante 1 hora a 121° C.
- La muestra hidrolizada se neutraliza a pH 7, con NaOH 10 y 0.5 M.
- Una vez ajustado el pH tomar 2 ml de de la muestra y mezclarla con una solución A (1 ml de acetilacetona en 50 ml de carbonato de sodio 0.5 N) y 1 ml de agua destilada.
- Llevar a baño maría esta mezcla durante 15 min enfriar los tubos y adicionar inmediatamente 4 ml de etanol.
- Después adicionar 1 ml de la solución B (0.8 g de PDBA disuelto en 30 ml de HCl 9 N y 30 ml de etanol) y un 1 ml de etanol, agitar perfectamente esta muestra y dejarla reposar en la oscuridad durante 30 min, tiempo en el que se lleva a cabo la reacción.
- Finalmente las muestras se leyeron en el espectro a una longitud de onda de 530 nm. Se hizo una curva patrón con estándar de glucosamina (0-30 µg ml⁻¹) como se explica en el anexo 1.

6.5.3.2. Cinética de crecimiento de *A. rouxii* en cultivo líquido

Se realizó una fermentación líquida de *A. rouxii*, para encontrar la relación entre la biomasa seca y su contenido de glucosamina, así como, para determinar la cantidad de biomasa (mg) producida. El muestreo se realizó cada 12 horas hasta las 96 horas. Dicha cinética se encuentra en el anexo 1.

6.5.4 Extracción del PCF

La extracción del PCF de las muestras de la fermentación sólida, se realizó de acuerdo a los estudios hechos por Cortés (2002), aunque también se le realizaron algunas modificaciones, pero se continuo empleando una solución amortiguadora de carbonatos a pH 10.6, para tenerlo solubilizado en su totalidad (Arcand *et al*, 1995).

Se pesaron 3 g de bagazo fermentado y se le agregaron 15 ml de solución amortiguadora de carbonatos pH 10.6 y con una barra magnética se mantuvieron cada una de las muestras en agitación durante 10 min para después sonicarlas durante un lapso de tiempo de 30 min. Posteriormente el bagazo se prensa para obtener el extracto y al cual se le ajusta el pH a 7, para su cuantificación. Las muestras se centrifugan a 1400 rpm y después se filtran en una membrana con tamaño de poro de 0.22 μm , para evitar daños a la columna. Entonces el PCF residual se cuantifica por HPLC, la recuperación de este compuesto fue del 95 -100 %, de acuerdo a los controles realizados en el tiempo cero de cada uno de los fermentaciones hechas.

6.5.5 Determinación y cuantificación de PCF

Para ello se monto la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC Waters 600). Se preparó una solución patrón de PCF a una concentración de 500 mg L⁻¹, disuelta en etanol y agua destilada (50:50), debido a que por sus propiedades físico-químicas no permite su solubilidad total en el agua. La solución patrón que se empleó fue 25 mg PCF L⁻¹ de la cual se realizaron las siguientes diluciones: 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 y 25 mg L⁻¹ para obtener una curva de calibración y así poder cuantificar el PCF residual de las muestras.

Se empleó un programa isocrático con detector ultravioleta marca Water (modelo 996) la determinación del PCF se hizo a una longitud de onda de 240 nm. La columna empleada fue una μ -Bondapack C18 (Water) de fase reversa. Como fase móvil se utilizó H₂O/ ácido acético al 1% y Acetonitrilo/ ácido acético 1%, en proporción 25:75, la cual debe ser filtrada con vacío utilizando membranas de 0.45 μ m de tamaño de poro y el flujo empleado de dicha fase en el equipo fue de 1.5 ml min⁻¹. Los reactivos empleados son de grado HPLC de marca Baker. Se inyectaron 20 μ l de muestra y el tiempo de retención del PCF fue de 3.05 min.

VII. RESULTADOS

7.1 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SÓLIDO PARA EL CRECIMIENTO DE *A. rouxii*

7.1.1 Influencia del tamaño de inóculo

Las fermentaciones en estado sólido generalmente se inoculan con esporas, para controlar mejor el tamaño del inóculo y su homogeneidad en el medio (Barrios *et al.*, 1988). Se ha demostrado que al aumentar la concentración de esporas (10^4 a 10^8) se obtiene un mejor desarrollo de micelio, producción de metabolitos (penicilina) e incluso de actividad enzimática (α -galactosidasa, xilanasa, tanasa) (Tunga, 1998; Wang *et al.*, 2004; van de Lagemaat, 2004; Park *et al.*, 2002). Por tales razones se estudió el efecto de dos tamaños de inóculo (de 1×10^7 a 1×10^8 esp ml^{-1}) en el crecimiento de *A. rouxii*; el resto de las condiciones de la fermentación fueron, 70 % de humedad, 0.12 L aire $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$, pH 5.5 y la temperatura de 30° C.

Se hicieron observaciones al microscopio de fragmentos de bagazo de 72 h de cultivo y no se encontraron diferencias en el crecimiento los dos tamaños de inóculo, por lo tanto en los siguientes estudios se utilizó 1×10^7 esporas g^{-1} de bagazo.

7.1.2 Influencia del soporte, bagazo y bagacillo de caña, en el crecimiento de *A. rouxii*

Debido a cambios técnicos en los ingenios, ya solo se obtiene el bagazo y ya no bagacillo (medula sin cáscara) como desecho (Cortés *et al.*, 2002), por lo tanto se decidió probar bagazo y bagacillo para determinar si esto podría estar influyendo también sobre el crecimiento, ya que se ha demostrado que el tamaño de partícula influye en la producción de penicilina por fermentación en estado sólida (Barrios *et al.*, 1993). No se observaron

diferencias significativas, tanto la humedad como el pH tuvieron un comportamiento similar en ambos soportes (Fig. 5).

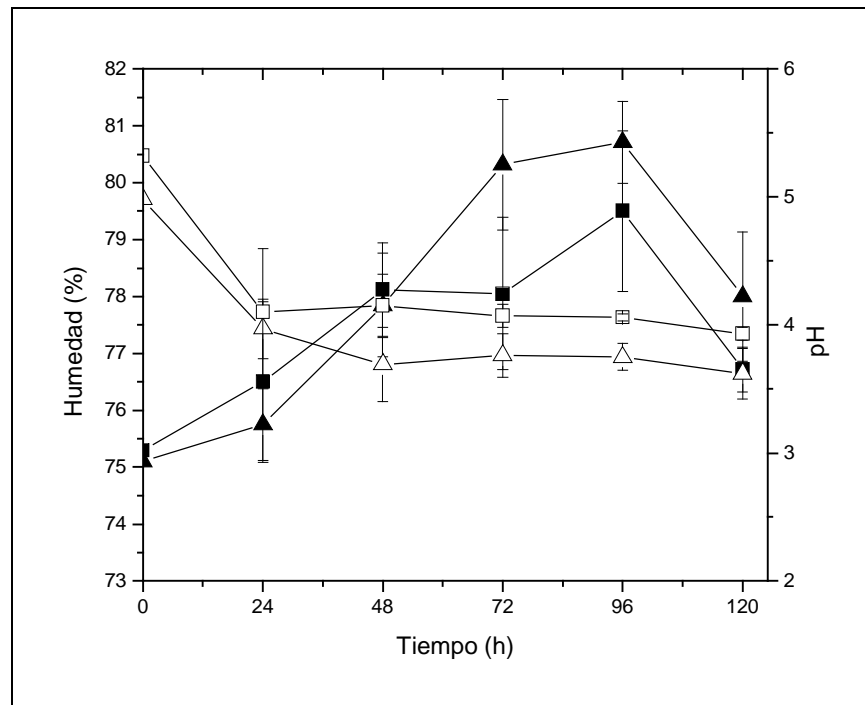


Figura 5. Comportamiento de humedad y pH en cultivo sólido con *A. rouxii*

En cuanto al crecimiento, se observó que en ambos soportes (bagazo y bagacillo) el perfil es similar, teniendo a las 96 la mayor cantidad de micelio registrado (4.07 y 3.82 mg micelio g^{-1} msi), no se mostró una diferencia significativa entre ambos soportes, excepto a las 72 h (Fig. 6). Los resultados permiten concluir que la fermentación sólida procede en forma similar en ambos soportes y que el tamaño y tipo de partícula para *A. rouxii* no afecta el crecimiento, el resto de los experimentos se trabajó con bagazo de caña, que es el que se consigue actualmente.

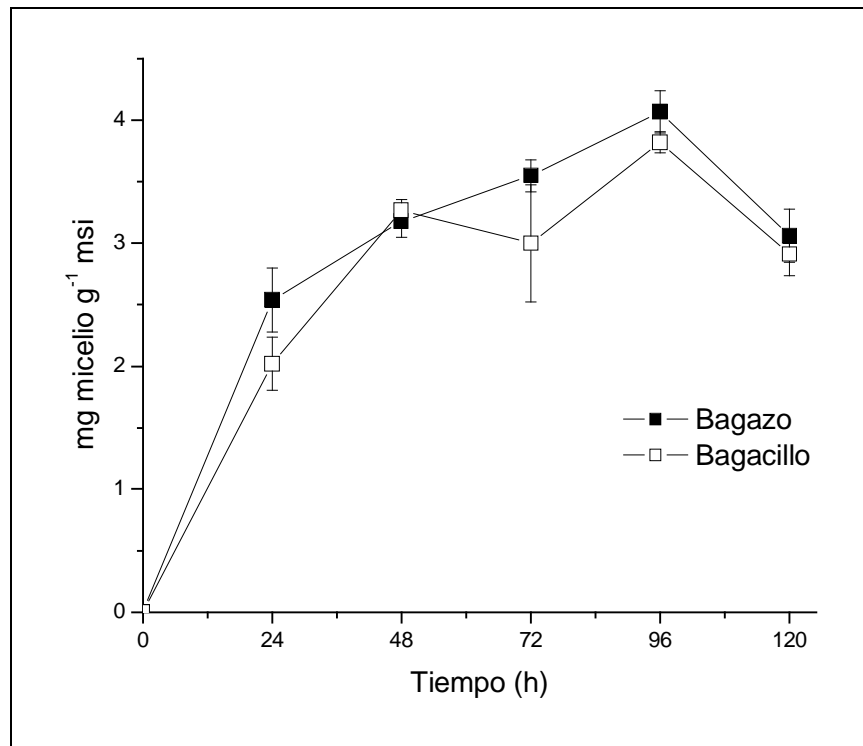


Figura 6. Determinación del crecimiento de *A. rouxii*, por medio de glucosamina, en cultivo sólido empleando como soporte, bagazo y bagacillo.

7.1.3 Efecto de la composición del medio de cultivo

Una vez determinado que el tamaño de inóculo y el soporte no afectan el crecimiento de *A. rouxii*, se decidió enriquecer el medio de cultivo con más nutrientes, aumentando la concentración de glucosa (de 20 a 25 g L⁻¹) y adicionando extracto de malta (2 g L⁻¹). El crecimiento observado en el microscopio, fue mayor en los cultivos con medio enriquecido que en los que contenían el medio normal. Estos resultados fueron comprobados por la determinación de glucosamina ya que se observa que hubo mayor crecimiento de *A. rouxii*, en el medio enriquecido que en el medio normal (Fig. 7). En el gráfico se observa claramente que

el mayor contenido de biomasa se registró a las 96 horas en el medio de cultivo modificado, con un incremento en la concentración de biomasa del 34 %.

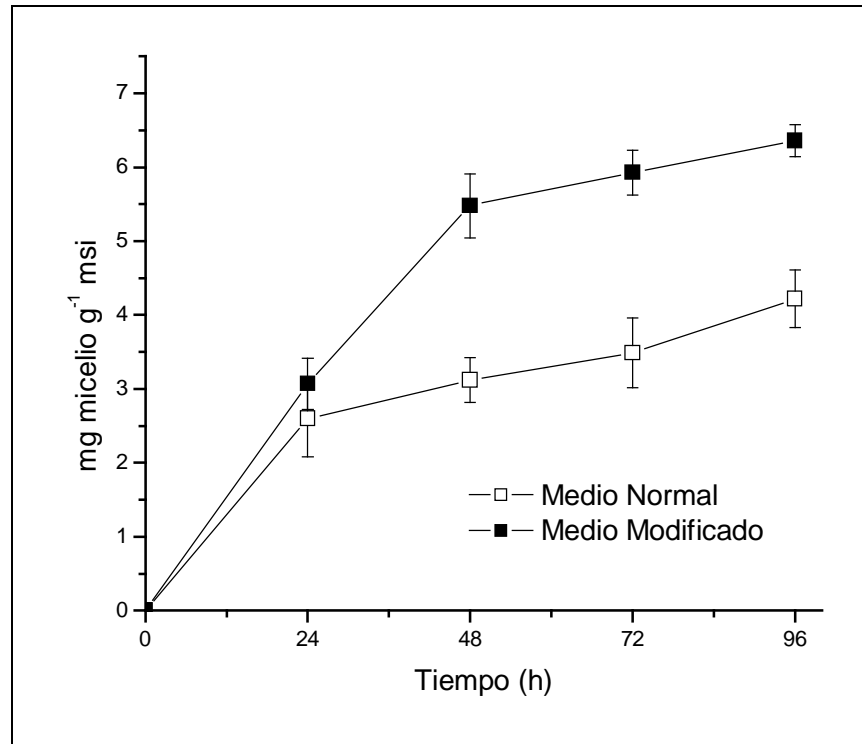


Figura 7. Cinética de crecimiento de *A. rouxii* en SFS, con bagazo de caña como soporte impregnado con medio M-N normal y modificado.

La diferencia en el crecimiento se comenzó a registrar a partir de las 48 h de cultivo 3.12 y 5.48 mg micelio g⁻¹ msi, para medio normal y modificado respectivamente. Tal diferencia se continuó presentando hasta el final del cultivo (96 h) encontrándose así mayor crecimiento en el medio modificado (6.36 mg micelio g⁻¹ msi) que en el medio original (4.22 mg micelio g⁻¹ msi). Este es el resultado de 3 replicas y se demuestra que hay una diferencia significativa en el crecimiento del hongo.

Este resultado es importante, debido a que uno de los principales objetivos era encontrar las mejores condiciones para el crecimiento de *A. rouxii* en cultivo sólido. A partir de este momento se utilizó el medio enriquecido o modificado en los siguientes experimentos realizados en este trabajo.

7.1.4 Efecto de la humedad inicial

Se estudió también el efecto de la humedad inicial en el crecimiento de *A. rouxii*. Las humedades iniciales probadas fueron 70, 75 y 80 %.

Con las tres humedades iniciales probadas se observó crecimiento de *A. rouxii* (Fig. 8). A partir de las 48 h se observa el doble de micelio producido en el cultivo con 80% de humedad inicial con respecto al micelio obtenido en los cultivos con 70 y 75% de humedad inicial. Esta diferencia se hizo mayor al final del cultivo, 96 h, registrándose el menor crecimiento con 70 % de humedad (5.06 mg micelio g⁻¹ msi) y el mayor crecimiento se encontró en el cultivo con 80 % (8.87 mg micelio g⁻¹ msi), es decir 60% mas de micelio en este último. Es importante mencionar que los resultados presentados en el gráfico son el promedio de tres valores, con una desviación estándar en el crecimiento de 0.47 para la humedad de 80%, donde se registro la mayor cantidad de biomasa, por lo que se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las humedades iniciales estudiadas.

De esta manera se demostró que la humedad inicial así como la modificación del medio, fueron los factores que influyeron en el crecimiento de *A. rouxii*.

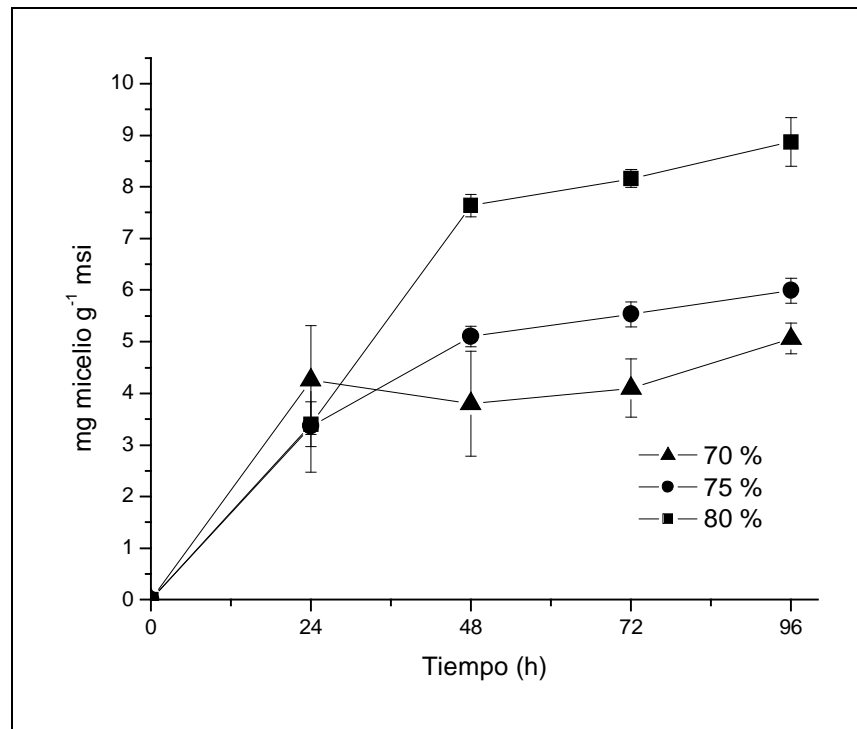


Figura 8. Cinética de crecimiento de *A. rouxii* en SFS, con bagazo impregnado con medio modificado y tres humedades iniciales. Promedio de 3 valores, la desviación estándar de 0.47 para la humedad de 80% en 96h.

En lo que se refiere a la humedades presentadas sobre el cultivo de encontró que se incrementa durante la fermentación aunque en un rango proporcional a la humedad inicial (Fig. 9). Mientras que el pH (Fig. 10), con las tres humedades estudiadas, se mantiene en un rango de 3.7 a 4.5. El descenso es más pronunciado en el de 80 % de humedad, indicando una mayor actividad metabólica.

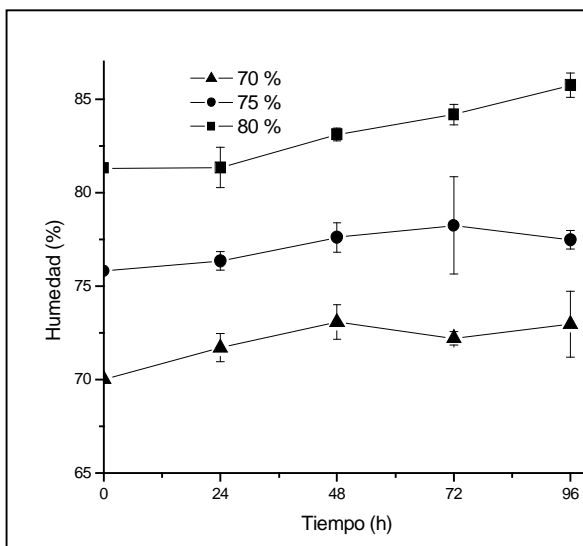


Figura 9. Comportamiento de la humedad

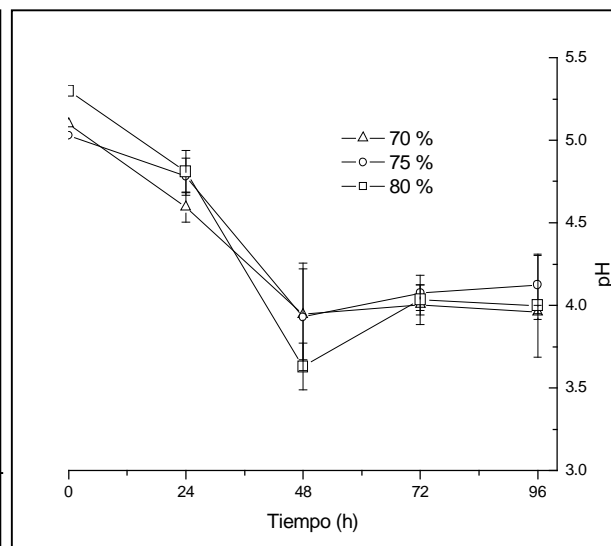


Figura 10. Comportamiento del pH

Las condiciones seleccionadas se encuentran resumidas en la tabla 4, mismas que se emplearon para el estudio de la degradación del PCF.

Tabla 4. Condiciones seleccionadas para el crecimiento de *A. rouxii* en fermentación sólida.

Medio de cultivo	Melin-Norkrans (Modificado) (25 g L ⁻¹ glucosa, 2 g L ⁻¹ extracto de malta)
pH	5.5
Humedad	80 %
Tamaño de inóculo	1 x 10 ⁷
Temperatura	30° C
Aireación	0.12 L g ⁻¹ h ⁻¹

7.2 ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE PCF EN CULTIVO SÓLIDO POR *A. rouxii*

Una vez determinadas las condiciones de crecimiento de *A. rouxii* en cultivo sólido, el siguiente punto a estudiar fue la capacidad de degradación del pentaclorofenol.

Se realizaron ensayos con $12.5 \text{ mg PCF L}^{-1}$ para observar la degradación en los dos medios de cultivos estudiados, normal y modificado. Dicho estudio se realizó con la finalidad de determinar si la adición de mas nutrientes (glucosa y extracto de malta) en el cultivo, tuviera repercusión sobre la degradación del PCF, ya que al tener mas nutrientes probablemente el hongo no degradaría a dicho compuesto. Los valores de degradación se muestran en la tabla 5, para ambos cultivos.

Tabla 5. Degradación de PCF en cultivos sólidos empleando medio Melin-Norkrans normal y modificado.

Tiempo (h)	PCF residual	
	Medio Normal (mg L^{-1})	Medio Modificado (mg L^{-1})
0	11.97	11.99
72	6.96 ± 1.355	4 ± 0.418
96	4.06 ± 0.763	2.23 ± 0.179

La recuperación inicial del PCF obtenida fue del 95% de los 12.5 mg L^{-1} de PCF adicionado; y en lo que se refiere a la degradación se observa claramente como se remueve mayor cantidad del compuesto en el cultivo suplementado con glucosa y extracto de malta, 2.2

mg PCF residual L^{-1} mientras que el medio de cultivo normal se obtuvieron 4 mg PCF residual L^{-1} ambos en 96 h.

El crecimiento de *A. rouxii* en los cultivos sólidos se presenta en la tabla 6, así como sus respectivas desviaciones estándar para cada tratamiento y tiempo.

Tabla 6. Biomasa producida en cultivos sólidos con *A. rouxii*, con y sin PCF

Tiempo (h)	Medio Melin-Norkrans (Sin PCF)		Medio Melin-Norkrans (Con PCF)	
	Normal (mg micelio g^{-1} msi)	Modificado (mg micelio g^{-1} msi)	Normal (mg micelio g^{-1} msi)	Modificado (mg biomasa g^{-1} msi)
72	4.21 ± 0.052	8.14 ± 0.862	3.56 ± 0.542	7.26 ± 0.163
96	5.44 ± 0.569	9.46 ± 0.342	5.29 ± 0.230	8.90 ± 0.275

Los resultados muestran que efectivamente con mayor crecimiento de *A. rouxii* se tiene mayor degradación de PCF, pero esto no implica que el hongo sea más eficiente para degradar PCF. Se observó que la biomasa crecida en el medio normal presentó una tasa de degradación específica de $0.019 \text{ mg PCF mg}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$, mientras que la biomasa crecida en medio modificado tuvo una tasa de degradación específica de $0.015 \text{ mg PCF mg}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$ (tabla 7).

Esto implica que la hipótesis planteada al inicio de este trabajo se cumple en el sentido de que mayor biomasa resultó con mayor degradación. Pero se demostró que esta biomasa no resultó ser más eficiente para degradar el PCF. Por lo tanto se decidió estudiar si la tirosina

incrementa la eficiencia de degradación de la biomasa de *A. rouxii* en SFS, como se ha demostrado en cultivos líquidos (Montiel *et al.*, 2004).

Tabla 7. Tasa de degradación específica de PCF por *A. rouxii* en medio M-N normal y modificado

Tiempo (h)	Medio Normal	Medio Modificado
	Tasa de degradación (mg PCF mg ⁻¹ biomasa h ⁻¹)	Tasa de degradación (mg PCF mg ⁻¹ biomasa h ⁻¹)
72	0.019	0.015
96	0.015	0.011

7.3 EFECTO DE LA ADICIÓN DE TIROSINA EN LA DEGRADACIÓN DE PCF

Teniendo como antecedente que en cultivos líquidos la degradación de PCF se incrementa al adicionar tirosina, ya que probablemente actúa como inductor de la tirosinasa, la enzima responsable de la degradación (Montiel *et al.*, 2004), se decidió también estudiar el efecto de la adición de tirosina en los cultivos sólidos. En estos sistemas la transferencia de los nutrientes depende de la humedad presente, por lo que la concentración de nutrientes en fermentación sólida es mayor que en medio líquido (Barrios *et al.*, 1988). Las concentraciones de tirosina a ensayar también fueron mayores a las utilizadas en cultivo sumergido (Montiel *et al.*, 2004).

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de tirosina (0.1, 0.2, 0.25 y 0.3 g L⁻¹). Los controles fueron columnas sin tirosina, y el experimento se llevaría a cabo bajo

las condiciones de cultivo seleccionadas anteriormente. Las muestras se tomaron cada 12 h. la concentración de PCF obtenida con cada concentración de tirosina se muestra en la figura 11.

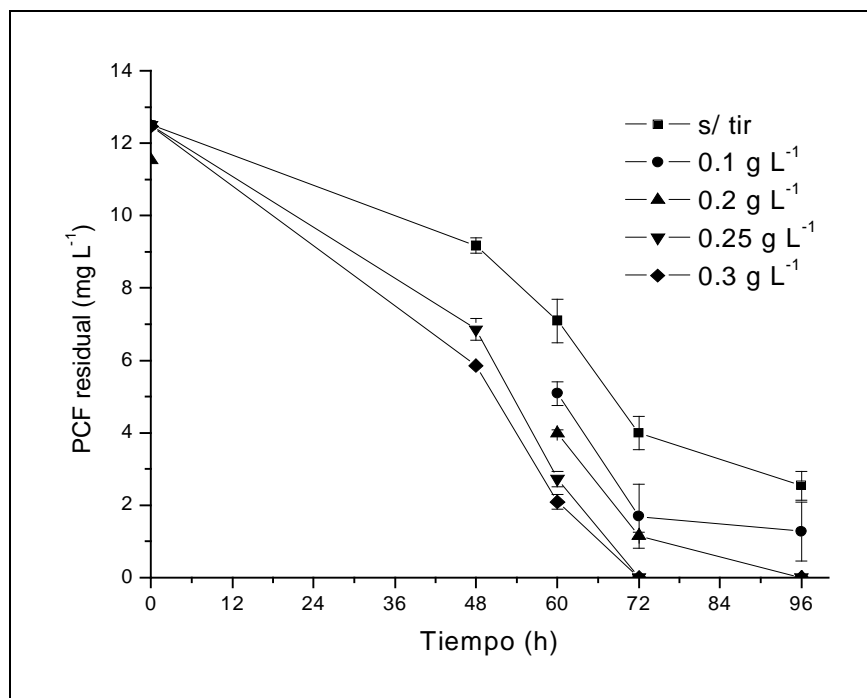


Figura 11. Cinética de degradación de PCF por *A. rouxii* en SFS, con bagazo impregnado con medio M-N modificado, 80 % de humedad y diferentes concentraciones de tirosina.

El efecto positivo que ejerce la tirosina sobre la degradación se confirma con este experimento. Se observó a las 72 h, 60 % de degradación del PCF inicial (12.5 mg L^{-1}) en el cultivo control, en los cultivos con 0.1 y $0.2 \text{ g tirosina L}^{-1}$ la degradación del PCF fue del 80%, mientras que en los cultivos con 0.25 y 0.3 g L^{-1} se encontró 100 % de degradación del PCF inicial. Los resultados de la gráfica presentan desviaciones estándares de 0.401 y 0.618 para el

control y 0.1 g tir L⁻¹, respectivamente, a las 96 h, mientras que para las 72 h la desviación estándar fue de 0.097 para 0.2 y de 0 para 0.25 y 0.3 g tir L⁻¹.

Los resultados dieron evidencia de que, para al menos una de las concentraciones de tirosina, se obtiene una media de degradación con *A. rouxii* significativamente diferente. Con la prueba de comparaciones múltiples (Tukey-Kramer), se encontró que entre las concentraciones de tirosina utilizadas con respecto al control (sin tirosina) difieren entre sí. Sin embargo, entre las concentraciones de 0.25 y 0.3 g tirosina L⁻¹ no se muestran diferencias, obteniéndose con estas dos concentraciones la mayor degradación de PCF, con un nivel de significancia de 0.05. Dichas diferencias están más marcadas a las 72 h de cultivo, lo cual confirma que la tirosina esta funcionando como inductor en la degradación del PCF, al eliminarse este compuesto en menor tiempo.

En lo que se refiera a la biomasa, se observó nuevamente que la adición de la tirosina pareciera no estar relacionada con el crecimiento del hongo, como se demostró en cultivo sumergido (Montiel *et al.*, 2004). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *A. rouxii* con las diferentes concentraciones de tirosina ensayadas e incluso con el control, sin tirosina (Fig. 12).

El análisis estadístico completo de los resultados de degradación y biomasa se muestran en anexo 2.

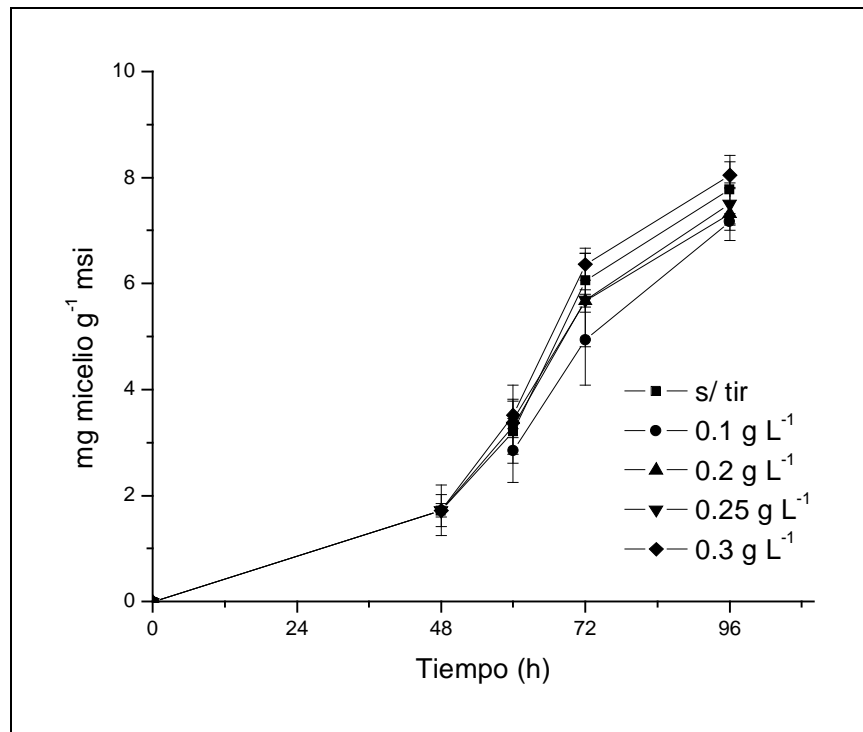


Figura 12. Cinética de crecimiento PCF por *A. rouxii* en SFS, con bagazo impregnado con medio M-N modificado, 80 % de humedad inicial y diferentes concentraciones de tirosina.

Los resultados muestran que la tirosina no tiene efecto en el crecimiento (Fig. 12), pero sí incrementa la capacidad de degradación de PCF, por *A. rouxii*. En los cultivos con 0.25 g tirosina L⁻¹ se obtuvo la mayor tasa de degradación específica, 0.30 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹ (tabla 8). Por lo tanto se seleccionó dicha concentración de tirosina para ser adicionada en los siguientes experimentos.

Tabla 8. Tasas de degradación específicas obtenidas a las 72 h de cultivo con *A. rouxii* empleando diferentes concentraciones de tirosina.

Tiempo 72 (h)	Tratamientos				
	Control (Sin tirosina)	0.1 g tir L ⁻¹	0.2 g tir L ⁻¹	0.25 g tir L ⁻¹	0.3 g tir L ⁻¹
Eficiencias (mg PCF mg ⁻¹ biomasa h ⁻¹)	0.016	0.028	0.025	0.030	0.028

Estos resultados permiten concluir que en los cultivos sólidos la tirosina también induce probablemente a la enzima responsable de la degradación, la tirosinasa, tal y como se reporta en cultivos líquidos logrando así mayor degradación en menor tiempo (Gukasyan, 1999; Marcial 2002; Montiel *et al.* 2004; Copley, 2000).

7.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PCF EN SU DEGRADACIÓN

Se estudió el efecto de la concentración inicial de PCF (12.5, 25, 50 y 100 mg L⁻¹) en la degradación de éste por *A. rouxii*. El cultivo se realizó hasta las 96 h, y el muestreo se llevó a cabo cada 24 h, los resultados de degradación para este experimento se muestran la Fig. 13.

La disminución del PCF se comienza a observar a partir de las 24 h de adicionado éste, independientemente de la concentración utilizada. Con la concentración de 12.5 mg L⁻¹ se encontró el 100 % de degradación a las 72 h tal y como se había presentado en los resultados anteriores. Con 25 mg PCF L⁻¹ la degradación registrada a las 96 h fue del 87 %, y para los cultivos con 50 y 100 mg PCF L⁻¹ se observó también el 100% de degradación del PCF inicial a la 72 h. La tasa de degradación de PCF fue mayor con la concentración de PCF más alta (2.32 h⁻¹), en las primeras 24 h de cultivo después de adicionado el PCF. Estas tasas de degradación tan altas pueden explicar el mayor crecimiento de *A. rouxii* ya que se están

formando intermediarios de la degradación y probablemente estos productos le sirvan como fuente de carbono para su crecimiento.

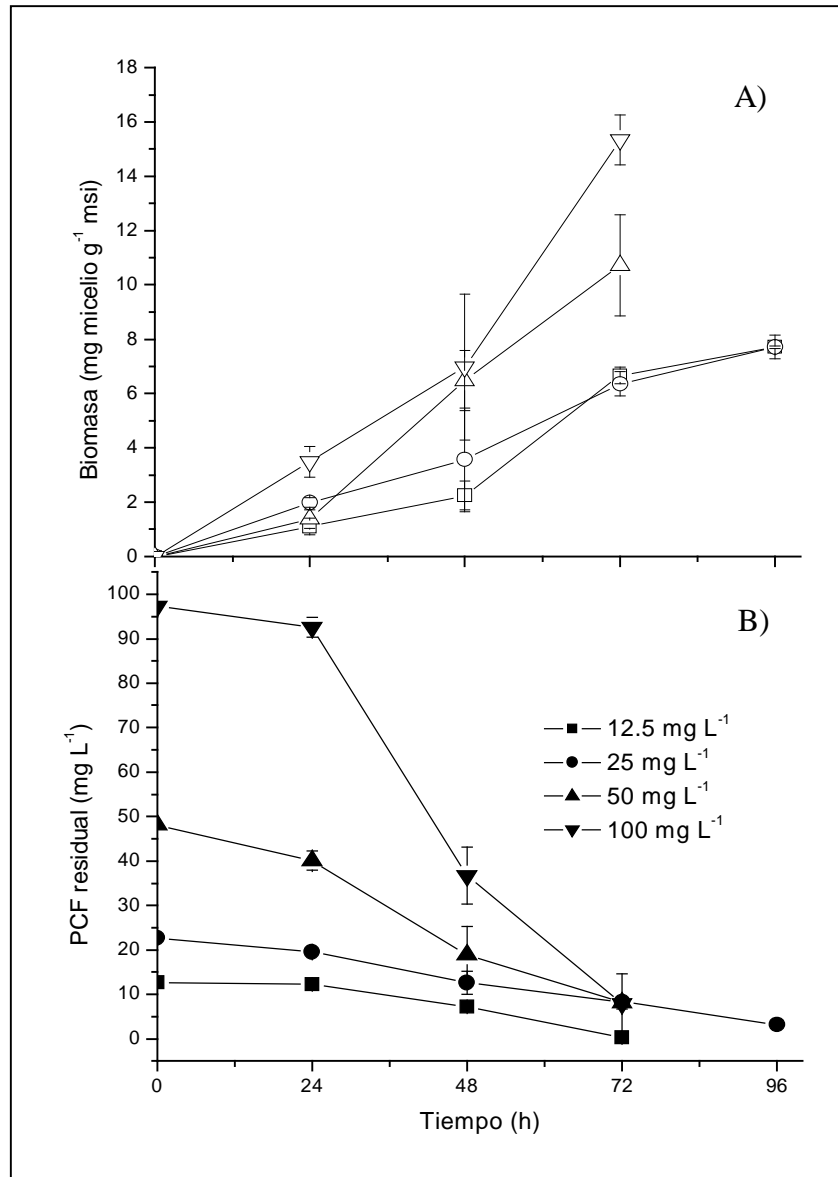


Figura 13. Cinética de crecimiento (A) y degradación (B) de PCF por *A. rouxii* en cultivos sólidos, en medio modificado, 80% de humedad inicial y adicionado con 0.25 g tirosina L⁻¹. (Símbolos negros indican degradación, símbolos blancos, biomasa).

Estudios anteriores empleando medio normal mostraron que con 50 y 100 mg PCF L⁻¹ el crecimiento de *A. rouxii* se inhibe, y que con 12.5 y 25 mg L⁻¹ el crecimiento fue muy pobre, 3.6 ml CO₂ h⁻¹ g⁻¹ msi (Cortés *et al.*, 2002). En los experimentos realizados en este trabajo se usó el medio modificado y se adicionaron 0.25 g tirosina L⁻¹. Los resultados mostraron que *A. rouxii* creció más con mayor concentración de PCF 16 y 10 mg biomasa g⁻¹ msi con 100 y 50 mg PCF L⁻¹ respectivamente a las 72 h. Con 12.5 y 25 mg PCF L⁻¹ el máximo crecimiento observado fue de 6 mg biomasa g⁻¹ msi, también al las 72 h, tal y como se muestra en la figura 13. La tasa de producción de CO₂ fue medida, para comparar con la tasa obtenida anteriormente por Cortés *et al.* (2002). En este trabajo las tasas de producción de CO₂ fueron mas altas, 4.2 y 4.9 ml CO₂ g⁻¹ h⁻¹ msi, en los cultivos con 12.5 y 100 mg PCF L⁻¹, que las reportadas por Cortés *et al.*, (2002), 3.5 ml CO₂ g⁻¹ h⁻¹ msi. La concentración inicial de PCF afectó el tiempo en que se obtienen la máxima producción de CO₂, para 100 mg PCF L⁻¹ se obtuvo a las 36 h, mientras que para las otras concentraciones de PCF ensayadas el tiempo en que se obtuvo la máxima producción de CO₂ fue entre las 24 y 28 h de cultivo (tabla 9).

Tabla 9. Producción de CO₂ durante el crecimiento *A. rouxii* con diferentes concentraciones de PCF

Concentración PCF (mg L ⁻¹)	Tiempo (h)	ml CO ₂ h ⁻¹ g ⁻¹ msi
12.5	24	4.23 ± 0.084
25	29	4.55 ± 0.572
50	26	4.5 ± 0.954
100	36	4.91 ± 0.827

Nota: estos resultados son promedio de dos replicas

Los resultados confirman que la concentración inicial de PCF afecta directamente en la eficiencia de degradación de PCF, ya que en los cultivos con 100 mg PCF L⁻¹ la tasa de degradación específica fue de 0.0809 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹, mientras que en los cultivos con 12.5 mg PCF L⁻¹ la tasa fue de sólo 0.0257 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹, a las 72 h de cultivo (tabla 10).

Tabla 10. Tasas de degradación específicas obtenidas con diferentes concentraciones de PCF.

	Tasa de degradación (mg PCF mg ⁻¹ biomasa h ⁻¹)			
Tiempo (h)	12.5 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
24	0.0127	0.0676	0.2436	0.0564
48	0.0498	0.059	0.094	0.1807
72	0.0257	0.0315	0.0518	0.0809

Una posible explicación de estos resultados es que a altas concentraciones de PCF se inducen las enzimas responsables de la degradación (oxigenasas principalmente), como se ha demostrado con algunas bacterias como *S. Chlorophenolica*, *Flavobacterium sp.* (Cassidy 1999) y hongos como el *P. chrysosporium*. Se ha demostrado que la tirosinasa también se induce por la presencia de PCF (Montiel *et al.*, 2004). Por lo tanto, se presenta una rápida formación de intermediarios que son empleados como fuente de carbono y energía. Es por ello que en el momento que se observa la rápida degradación de PCF, de las 24-72 h con las concentraciones de 50 y 100 mg L⁻¹ es también cuando se presentan los mayores registros de biomasa lo que hace suponer que el sistema enzimático del hongo actúa formando los

intermediarios de la ruta de degradación y los emplea a su vez como fuente de carbono, logrando así un mayor crecimiento en estos cultivos.

7.5 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE PCF CON *A. rouxii*

Se ha demostrado también que con tasas bajas de aireación o incluso cortes de aireación en sistemas de fermentación sólida, se incrementa la producción de metabolitos secundarios (Barrios *et al.*, 1993; Shary-Bagnon *et al.*, 2000). Por lo que se estudió si la aireación también influye en la degradación del PCF. Se ensayaron tres niveles de aireación (0.04, 0.12 y 0.16 L g⁻¹ h⁻¹), la concentración de PCF fue de 100 mg L⁻¹ y el resto de las condiciones de cultivo fueron las mismas.

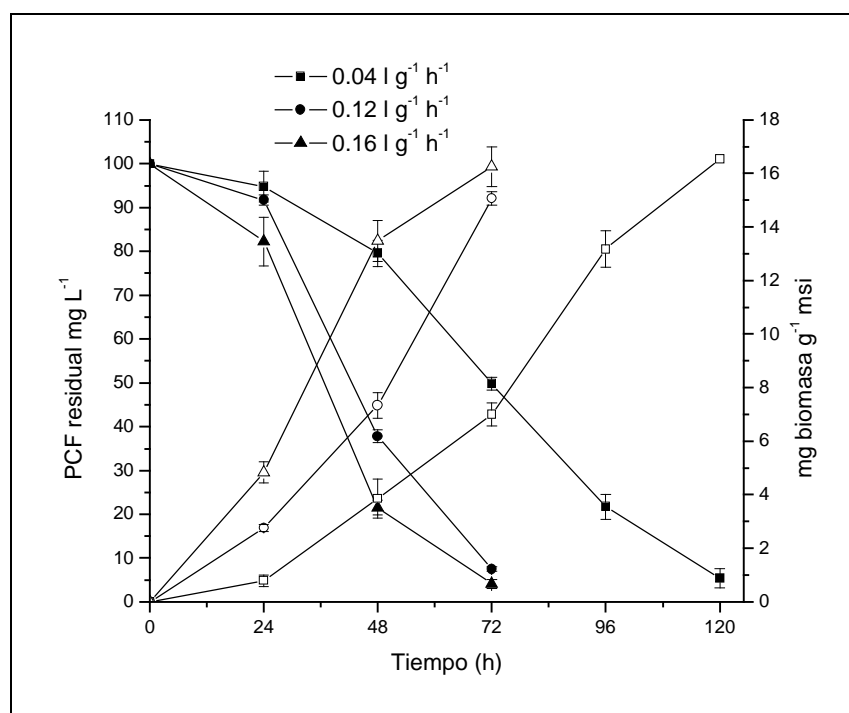


Figura 14. Crecimiento de *A. rouxii* y degradación de PCF en cultivo sólido con diferentes tasas de aireación.

Los resultados indican que con una aireación baja ($0.04 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tanto la degradación como el crecimiento del hongo, fueron más lentos, aunque para las 120 h se obtiene un registro del 96 % de eliminación del tóxico y $16.5 \text{ mg micelio g}^{-1} \text{ msi}$, casi los mismos registros que se obtienen con los otros niveles de aireación (Fig. 14). A las 48 h con $0.12 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ la degradación ya era del 61 %, mientras que para $0.16 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en este tiempo ya se registraba el 77 % de eliminación.

El micelio fue claramente visible en las columnas a partir de las 48 h, y que su máximo crecimiento se obtuvo a las 72 h, y se presentó una fuerte esporulación, razón por la cual el muestreo con las aireaciones de 0.12 y $0.16 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ solo se llevó a cabo hasta ese tiempo. A pesar de ello la remoción del PCF para $0.12 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ fue del 92 % y con $0.16 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ fue del 96% (igual que con la aireación más baja). En lo que se refiere al desarrollo del hongo en todos los cultivos se mostró casi la misma cantidad de biomasa producida y con el mismo perfil de crecimiento con los tres niveles de aireación estudiados $16.5 \text{ mg micelio g}^{-1} \text{ msi}$ a las 120 h con $0.04 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 15 y $16.2 \text{ mg micelio g}^{-1} \text{ msi}$ a las 72 h con 0.12 y $0.16 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, aunque a partir de las 24 h con este último nivel ya se comienzan a ver diferencias importantes sobre el resto de los cultivos.

Los resultados indican que en fermentación en estado sólido *A. rouxii* crece y degrada PCF, demostrándose que la degradación es más rápida cuando se emplean tasas de aireación altas ($0.16 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para este hongo.

VIII. CONCLUSIONES

Ø Se demostró que la humedad tiene un efecto sobre el crecimiento de *A. rouxii* en fermentación en estado sólido. El contenido de biomasa producida a una humedad de 70 % fue de 5 mg micelio g⁻¹ msi y de 8.87 mg micelio g⁻¹ msi para la humedad de 80%, demostrándose que estas diferencias son significativas.

Ø La falta de nutrientes en el medio de cultivo era la causa del bajo crecimiento de *A. rouxii* presentado en este sistema, ya que al modificar el medio Melin-Norkrans (25 g L⁻¹ glucosa y 2 g L⁻¹ extracto de malta) el contenido de biomasa producida (6.36 mg micelio g⁻¹ msi) aumentó notablemente, en comparación con el medio de cultivo normal (4.22 mg micelio g⁻¹ msi). En el medio modificado se observó mayor degradación de PCF (81%) que en el medio normal (66 %) a las 96 h, esto cumple en parte la hipótesis planteada al inicio, sin embargo, se demostró que la biomasa crecida en ambos sistemas presentó prácticamente la misma eficiencia.

Ø La tirosina también tiene un efecto positivo en la degradación de PCF en cultivos sólidos, se obtuvo 100 % de degradación a las 72 h de cultivo a una concentración de 0.25 g tirosina L⁻¹, mientras que en los cultivos sin tirosina la degradación fue sólo de 89 % en 96 h. Lográndose con esto que la biomasa fuera más eficiente al adicionarle la tirosina al medio, independientemente de la concentración empleada, aunque con 0.25 g L⁻¹ se obtuvo la tasa de degradación específica más alta 0.030 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹, y sin tirosina solo de 0.019 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹.

Ø En cultivos sólidos se observó, que al aumentar la concentración de PCF la degradación y crecimiento fue mayor. Para cultivos con una concentración de 12.5 mg L⁻¹ la tasa de degradación fue 0.025 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹, con 25 mg L⁻¹ fue 0.031 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹, para 50 mg L⁻¹ fue 0.051 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹ y para 100 mg L⁻¹ fue de 0.081 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹.

Ø Al aumentar la tasa de aireación (0.04 y 0.16 L g⁻¹ h⁻¹) el metabolismo se acelera, obteniéndose el crecimiento y la degradación en un menor tiempo (96 % en 72 h vs 94 % en 120 h).

Ø Se demostró que la hipótesis planteada se cumple parcialmente, puesto que con mayor crecimiento no implicó que esta fuera más eficiente para degradar PCF (0.015 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹), pero sí se logró aumentar dicha eficiencia de *A. rouxii* cuando se le adicionó tirosina al cultivo (0.030 mg PCF mg⁻¹ biomasa h⁻¹), principalmente cuando se manejaron concentraciones altas de PCF, 50 y 100 mg L⁻¹.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Ainsworth, A. M. Technical information sheet No.11: Isolation techniques for basidiomycetes. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 363-366. 1995.

Aitken, M. D. Waste treatment applications of enzymes; opportunities and abtacles. *The chemical engineering journal.* 52: 49-58. 1993.

Aitken, M. D., Irvine, R. L. Stability testing of ligninase and Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioengineering.* 34: 1251-1260. 1989.

Alexander, M. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, New York, 1999.

Al-Kassim, L. K., Taylor K. E., Nicell, J. A. Bewtra, J. A., Bewtra, J. K., Biswas, N. Enzymatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal preoxidase from *Coprinus macrorhizus* in bach reactors. *J. Cem. Tech. Biotechnol.* 61:179-182. 1994.

Alleman, B. C., Logan, B. E, Gilbertson R. L. Toxicity of pentachlorophenol to 6 species of white-rot fungi as a function of chemical dose. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 4048-4050.1992.

Anandarajah, K., Kiefer P. M., Donohoe B. S., Copley, S. D. Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol. *Biochemistry.* 39: 5303-5311. 2000.

Arcand, Y., Hawari, J. and Guiot, S. R. Solubility of pentachlorophenol in aqueous solution: The pH effect. *Wat. Res. (29) 1:* 131-136. 1995.

Barrios, G. J., Tomasini C. A., Viniegra, G. G. Penicillum production by state fermentation. *Biotechnology Lett.* 10: 793-798. 1988.

Barrios-González, J. Producción de metabolitos secundarios por fermentación sólida. Tesis de Doctorado. UNAM. 1994.

Barrios-González, J., Fernández, F. J. Tomasini, A. Production of microbial secondary metabolites and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology.* 2(3): 322-333. 2003.

Barrios-González, J., Castillo, T. E., Mejía, A. Development of high penicillin producing strains for state-solid fermentation. *Biotechnol. Adv.* 10: 793-798.1993.

Battaini, G., Monzoni E., Casella, L., Lonardi, E., Tepper A. W. J. Canters, G., Bubbaco L. Tyrosinase-catalyzed oxidation fluorophenols. *The Journal of Biological Chemistry.* 47: 44606-44612. 2002.

-
- Bernal, R. M., Cortés D. V., Tomasini C. A.** Determinación de las condiciones de cultivo para las degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans*. Memorias del XX encuentro nacional de la AMIDIQ, Puerto Vallarta, Jal. pp. 49-50. 1999.
- Bhasker, G. V. R., Gold, M. H.** Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. Microbiology. 146: 405-413. 2000.
- Bollag, J-M.** Decontaminating soil with enzymes. Environmental Science and Technology. 26: 1876-1881. 1992.
- Bollag, W. B., Bollag, J. M.** Biodegradation. Encycl. . Microbiology. 1: 269-280. 1992.
- Boominithan, K. Reedy, C. A.** Fungal degradation of lignin. Biotech Appl. Environ. Microbiol. 763-782. 1992.
- Bouwer, E. J. Zehnder, A. J. B.** Bioremediation of organic compounds: microbial metabolism to work. Trends Biotechnol. 11: 360-367. 1993.
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S., Soccol C. R.** Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. Enzyme Microbiol. Technol. 27 (1-2): 127-133. 2000.
- Bumpus J. A., Tien M. Wright, D., Aust S. D.** Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus. Science. 228: 1434-1436. 1985.
- Bumpus, J. A.** White-rot fungi and their potential use in soil bioremediation processes. In soil biochemistry. Bollag JM, Marcel Dekker INC. 65-100. 1993.
- Burton, S. G.** Biocatalysis with polyphenoloxidases: a review. Catal. Today. 22: 459-487. 1994.
- Cameron, M. D., Timofeuski, S., Aust, S. D.** Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobióticos. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 751-758. 2000.
- Cassidy, M. B., Lee, H., Trevors, J. T. and Zablutowics, R. B.** Chlorphenols and nitrophenols metabolism by *Sphingomonas* sp. UG30. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 23: 232-241. 1999.
- Commandeur L. C. M., Parsons, J. R.** Degradation of halogenated aromatic compounds. Biodegradation. 1: 207-220. 1991.
- Copley D. S.** Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. Elsevier Science Ltd. 25: 261-265. 2000.

Cortés, E. D. V. Estudio de la degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans* en cultivo sumergido y sólido. Tesis de maestría en Biotecnología. UAM-I. 2001.

Cortés, E. D. V., Barrios-González, J. Tomasini, A. Pentachlorophenol tolerance and removal by *Rhizopus nigricans* in solid-state culture. *Process Biochemistry* 37: 881-884. 2002.

Cortés, E. D. V., Bernal, R. Tomasini, A. Efecto de las condiciones de cultivo sumergido en la degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans* *Información Tecnológica*. 12 (2): 75-80. 2001.

Cullen, D., Kersten P. Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In *applied molecular genetics of filamentous fungi*. Edited by Kinghorn JR, Turner G. Glasgow; Blackie Academic and Professional (Chapman & Hall). 100-131. 1992.

Chen, W., Brühlmann, F., Richins, R. D., Mulchandani, A. Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 137-141. 1999.

Chevalier, T., Rigal, D., Mbégué-A- Mbégué, D. Gavillard, F. Richard-Forget, F. Fils-Lycaon. B. R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 119: 1261. 1999.

Chivukula, M and Renganathan, V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4374-4377. 1995.

D' Angello, E. Wetlands: Biodegradation of organic pollutants. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. 2003.

Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., Johri, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 143-152. 2002.

Durán, N., Esposito, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. 28: 83-99. 2002.

Durán, N., Rosa, M. A., D' Annibale A., Gianfreda, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized in different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 907-931. 2002.

Dúran, N., Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil. Treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*. 28: 83-99. 2000.

Eriksson, K. L., Blanchette, R. A., Agner, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer -verlag, Berlin Germany, pp. 225-233. 1990.

Fewson, C. A. Biodegradation of xenobiotic and others persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends Biotechnology*: 6: 148-153. 1988.

Fhar, K., Wetzstein, H. G., Grey, Roland., Schlosser, D. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 175: 127-132. 1999.

Flores, A. V. Evaluación de la capacidad para tolerar y degradar pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans*. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I. 2000.

Gallert, C., Winter, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturwissenschaften*. 89: 483-496. 2000.

Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R. Microbial production of extracellular phitase using polystyrene as inert solid support. *Bioresource Technol.* 83 (3): 229-233. 2002.

Gianfreda, L., Xu F., Bollag, J. M. Laccase; a useful group oxidoreductive enzymes, like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B Environ.* 28: Biorremediation J. 3:1-25. 1999.

Glazer, A. N., Nikaido H. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology.* Freeman, New York. 1995.

Gold, M. H., Alic, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57: 605-622. 1993.

Gukasyan, G. S. Effect of lignin on growth and tirosinase activity of fungi from the genus *Aspergillus*. *Biochemistry*. 64: 224-227. 1999.

Hammel, K. E. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 11: 916-920. 1989.

Hammel, K. E. Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidases. *Biotech. Appl.* 28: 41-60.1992.

Higuchi, T. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. *J. Biotechnol.* 30: 91-107. 1993.

Hiratsuka, N., Oyadomari, M., Shinohara, H., Tanaka, H., Wariishi, H. Metabolic mechanisms involved in hydroxylation reactions of diphenyl compounds by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*. 23 (3): 241-246. 2005.

-
- Hoogschagen, M., Zhu, Y., van As, H., Tramper, J., Rinzema, A.** Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation. *Biotechnol. Letters*. 23: 1183-1187. 2001.
- Husain , Q., Jan, U.** Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenoloxidases. *J. Sci. Ind. Res.* 59: 286-293. 2000.
- Ikehata, K., Nicell J. A.** Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidations of phenols. *Biotechnol. Prog.* 16: 533-540. 2000.
- Irwin, R. J.** Pentachlorophenol. *Environmental contaminants encyclopedia*. 1997.
- Ishizawa, S., Toyoda, H., Mantsuguchi, T.** Effects of DD, EDB and PCP upon microorganisms and their activities in soil. Part I. Effects on microflora. *Soil Plant Food Tokyo*. 6:145-155. 1961.
- Jan P.** Pentachlorophenol. *Environmental Contaminant Reference Databook, Volumes 1-3*. 1998.
- Johan, E. T., Vlieg, V. H., Janssen D. B.** Formation and detoxification of reactive intermediates in the metabolites of the chlorinated ethenes. *J. Biotechnol.* 85: 81-102. 2001.
- Johri, A. K., Dua, M., Tuteja, D., Saxena, R., Saxena, D. M., Lal, R.** Genetic manipulations of microorganisms for the degradation of hexachlorocyclohexane. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 69-84. 1996.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers H. J., Pello, G.** *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459. 1998.
- Jong, E., Field, J. A.** Sulfur Tuft and Turkey Tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogenes by basidiomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 375-414. 1997.
- Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S., Rastall, R. A.** Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 303-307. 1999.
- Kalman, D. A., Hortsman, S. W.** Persistence of tetrachlorophenol and pentachlorophenol in exposed woodwork. *J. Toxicol Clin. Toxicol.* 20: 343. 1986.
- Karam, J., Nicel , J. A.** Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal Chem. Tech. Biotechnol.* 69: 141-153. 1997.
- Karlson, U., Rojo, F., van Elsas, J., Moore, E.** Genetic and serological evidence for the recognition of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as a species of the genus *Sphingomonas*. *System Appl. Microbiol.* 18: 539-548.

-
- Key, B. D., Howell, D. R., Criddle, S. C.** Fluorinated organics in the biosphere. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2445-2454. 1997.
- Kirk, T. K., Farrell, R. L.** Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505. 1987.
- Lal, R., Lal, S., Shivaji, S.** Use of microbes for detoxification of pesticides. *Crit. Rev. Microbiol.* 3: 1-14. 1986.
- Lamar, R. T.** The role of fungal lining-degrading enzymes in xenobiotic degradation. *Curr. Biol.* 3: 261-266. 1992.
- Lee, S. G., Ion, B. D., Park, Y. H., Oh, M.** Isolation of a novel pentachlorophenol-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. Bu34. *J. Appl. Microbiol.* 85: 1-8. 1998.
- Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Evans, C. S., Golovleva, L. A.** Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation.* 11: 331-340. 2000.
- Leung, K. T., Tresse, O., Errampalli, D., Lee, H., Trevors, J. T.** Mineralization of *p*-nitrophenol by pentachlorophenol-degrading *Sphingomonas* sp. *FEMS Microbiol Lett.* 155: 107-114. 1997.
- Madsen, E. L.** Biodegradability: Methods for assessing biodegradability under laboratory and field conditions. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* 2003.
- Madsen, E. L., Burgale, R.** *Techniques in Microbial Ecology*, Oxford University Press, New York, pp. 354-407. 1998.
- Marcial, Q. J.** Efecto de la tirosina en la degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans* en cultivo sumergido. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 2002.
- Mayer, A. M., Staples, R. C.** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 60: 551-565. 2002.
- Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Christen, P., Fontoura, P. S. G., de Freitas, R. J. S., Socol, C. R.** Aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 767-771. 2001
- Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Freitas, R. J. S., Christen, P., Socol, C. R.** Optimization of production aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 6 (1): 33-39. 2000.
-

-
- McAllister, K. A., Lee, H., Trevors, J. T.** Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*. 7: 1-40. 1996.
- Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A., Aust S. D.** Biodegradation of pentachlorophenol by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2885-2889. 1988.
- Milleken, C. E., Meier, G. P., Watts, J. E. M. Sowers K. R., May H. D.** Microbial anaerobic demethylation and Dechlorination of chlorinated hydroquinone Metabolites synthesized by basidiomicete fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (1): 385-392. 2004.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., Durán, N.** Enzima de interés en eneología: lacasa. *Alimentaria*:. 304: 145-150. 1999.
- Mishra, V., Lal, R., Srinivasan, S.** Enzymes and operons mediating xenobiotics degradation in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 133-166. 2001.
- Mitchell, D. A., Berovic, M., Krieger, N.** Biochemical Engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 68: 61-138. 2000.
- Montiel, A. M., Fernández, F. J., Marcial, J., Soriano, J., Barrios-González, J., Tomasini, A.** A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradación. *Biotechnology Lett.* 26: 1353-1357. 2004.
- Moreira, M. T., Feijoo, G., Sierra-Alvarez, R., Lema, J., Field, J. A.** Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. *J. Biotechnol.* 53: 237-251. 1997.
- Mundgett, R. E.** Solid state fermentation. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Demain, A. L., Solomon, N. A. (Eds). American Society for microbiology. Washington. pp. 66-84. 1986.
- Nagarathama, R., Bajpai, P.** Decoloration and detoxification of extraction-stage effluent from chloride bleaching of kraf pulp by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1078-1082. 1999.
- Nampoothiri, K. M., Pandey, A.** Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium sp.* *Biotechnol. Lett.* 16 (2): 199-204. 1996.
- Nicell, J A., Al-Kassim, L. Bewtra, J. K. and Taylor, K. E.** Wastewater treatment by enzyme catalized polimeritation and precipitation. *Bioremediation abstracts.* 7 (1): 1-8. 1993.
- Nigam, P., Singh, D.** Processing of agricultural wastes in solid-state fermentation for microbial protein production. *J. Sci. Ind. Res.* 55: 373-380. 1996.
-

- Nohynek, L. J., Suhonen, E. L., Nurmiäho-Lassila, E. L., Salkinoja-Salonen, M.** Description of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as *Sphingomonas chlorophenolica* sp. Nov. System Appl. Microbiol. 18: 527-538. 1996.
- O'Reilly, K. T., Crawford, R. L.** Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells. Appl. Environ Microbiol. 55: 2113-2118. 1989.
- Okeke, B. C., Paterson, A., Smith, J. E., Watson-Craik, I. A.** Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 563-569. 1997.
- Okeke, B. C., Paterson, A., Smith, J. E., Watson-Craik, I. A.** Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 263-266. 1996.
- Palma, C., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M.** In vitro of the dye ply R-478 by crude and semipurified manganese preoxidase, in: M. Paice, J. Saddler (Eds), Proceedings of the 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and paper Industry, Vancouver, Canada. Chem Abstr. Vol. 7B, p. 103. 1999.
- Pandey A.** Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 13: 81-84. 2003.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S., Mohan, R.** Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugar cane bagasse. Bioresource Technol. 74: 69-80. 2000.
- Pandey, A, Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S.** Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochem. Eng. J. 6 (2): 153-162. 2000.
- Pandey, A., Soccol, C. R.** Economic utilization of crop residues for value addition-a futuristic approach. J. Sci. Ind. Res. 59 (1): 12-22. 2000.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. A.** New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products, Process Biochem. 35 (10): 1153-1169. 2000.
- Pandey, A.** Recent process developments in solid-state fermentation. Process Biochem. 27 (2): 109-117. 1992.
- Park, Y. S., Kang, S. W. Lee, J. S., Hong, S. I.** Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. Appl. Microbiol Biotechnol. 58: 761-766. 2002.
- Paszczynski, A., Crawford, R. L.** Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol Prog. 11: 368-379. 1995.

-
- Peralta-Perez, M. R., Saucedo-Castañeda, G., Gutierrez-Rojas, M., Campero, R.** SiO₂ xerogel: a suitable inert support for microbial growth. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 20 (1): 105-110. 2001.
- Pfender, W. F., Maggard, S. P., Gander L. K., Watrud L. S.** Comparison of three bioremediation agents for mineralization and transformation of pentachlorophenol in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 230-237. 1997.
- Pointing S. B.** Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33. 2001.
- Prince, R. C.** Bioremediation: An overview of how microbiological processes can be applied to the cleanup of organic and inorganic environmental pollutants. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* 2003.
- Rabinovich, M. L., Boloboba, A. V., Vasil'chenco, L. G.** Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 40 (1): 5-23. 2004.
- Radehaus, P. M., Schmidt, S. K.** Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. That mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2879-2885. 1992.
- Reedy, C. A.** The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology.* 6: 320-328. 1995.
- Resnick, S. M., Chapman P.J.** Physiological properties and substrate specificity of a pentachlorophenol-degrading *Pseudomonas* species. *Biodegradation.* 5: 47-54. 1994.
- Ricotta, A., Uns, R. F., Bollag, J. M.** Role of a laccase in the degradation of pentachlorophenol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 560-567. 1996.
- Riegert, U., Heiss, G., Fischer, P., Stolz, A.** Distal clavage of 3-catechol by an extradiol dioxygenase to 3-chloro-2-hydroxamic semialdehyde. *J. Bacteriol.* 180: 2849-2853. 1998.
- Riley, P. A.** Tyrosinase Kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *J. Theor. Biol.* 203: 1-12. 2000.
- Rodríguez-López, J. N., Fenoll, L. G., Peñalver, M. J., García-Ruiz, P. A., Varón, R., Martínez-Ortíz, R, García-Canovas, F., Tudela, J.** Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1548:238-256. 2001.
-

Rodríguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R. F. P., Ferrer, I., Esposito, E., Durán, N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. Appl. Biochem. Biotechnol. 62: 233-242. 1997.

Roy, J. I. Pentachlorophenol (PCP). Environmental contaminants enciclopedia. Compilers/editor. 1997.

Sarhy-Bagnon, Lozano, P., Saucedo-Castañeda, G., Serastianos, R. Production of 6-pentyl α pyrone by *Trichoderma harzianum* in by liquid and solid state cultures. Process biochemistry. 103-109. 2000.

Sánchez, F. A., Rodrigues, L. J. N., Garcia, C. F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 1247: 1-11. 1995.

Scott, R. N., Cameron, D. M., Aust, D. Steven. Fungi, for biotechnology. Encyclopedia of Environmental Microbiology. 1-4. 2003.

Schmidt, J., Szakacs, G., Cenkvari, E., Sipocs, J., Urbanszki, K., Tengerdy, R. P. Enzyme assisted ensiling of alfalfa with enzymes by solid substrates fermentation. Bioresource Technol. 76: 207-212. 2001.

Selvakumar, P. Pandey, A. Solid-state fermentation for the synthesis of ilunilase from the strains of *Staphylococcus* and *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochem. 34 (8): 851-855. 1999.

Singh, B. K., Kuhad, R. C., Singh, A., Lal, R., Tripathi, K. K. Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. Crit. Rev. Biotechnol. 19: 197-225. 1999.

Soares, M., Christen, P., Pandey, A., Soccol, C. R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. Process Biochem. 35 (8): 857-861. 2000.

Solomon. E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E. Multicopper oxidases and oxigenases. Chem. Rev. 96: 2563-2605. 1996.

Steffens, J. C., Harel, E., Hunt, M. D., Thipyapong, P. Polyphenol oxidase. Colloq. Inst. Natl. Rech. Agron. 87 (Polyphenols 96). Chem. Abstrac. 129: 92096. 1998.

Steiman, R., Benoit-Guyod, J. L., Seigle-Murandi, F., Sage, L. Toe, A. Biodegradation of pentachlorophenol by micromycetes. 2. Ascomycetes, basidiomycetes, and yeasts. Environ. Toxicol. Water Qual. 9: 1-6. 1994.

Szewczyk, R., Bernat, P., Milczarek, K., Długonski, J. Application of microscopic fungi isolated from polluted industrial areas for polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol reduction. Biodegradation. 14: 1-8. 2003.

Tam, T. Y., Trevors J. T. Toxicity of pentachlorophenol to *Azobacter vinelandii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 27: 230-234. 1981.

Thurston, C. F. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26. 1994.

Tomaselli, S. C., Vergoignan, C., Feron, G., Durand A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. Biochemical Engineering Journal. 7: 1-5. 2001.

Tomsovský, M., Homolka, L. Tyrosinase activity discovered in *Trametes spp.* World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 529-530. 2004.

Tomasini, A., Villarreal, H. Barrios-González, J. Resistencia de una cepa de *Rhizopus sp.* al crecer en medios conteniendo pentaclorofenol. Avances en Ingeniería Química. 6 (1): 36-40, 1996.

Tomasini, A., Flores, V., Cortés, D., Barrios-González, J. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. World of Journal of Microbiology and Biotechnology. 17: 201-205. 2001.

Tunga, R., Banerjee, R., Bhattacharyya B. C. Optimizing some factors affecting protease producción under solid state fermentation. Bioprocess Engineering. 19:187-190. 1998.

Turco, R. Soil Microorganisms: role in biodegradation. Encyclopedia of Environmental Microbiology. 2003.

Ulla, M. A., Kadhim, R. A., Evans, C. S. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 832-837. 2000.

Van de Lagemaat, J., Pyle, D. L. Solid-state fermentation: a continuous process for fungal tannase production. Biotechnology and Bioengineering. 87 (7): 924-929. 2004.

Venkatadri, R and Irvine, R. L. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporum* and production of lignin peroxidase in novel biofilm reactor system: hollow fiber reactor and silicone membrane reactor. Water research, 27: 591-600. 1993.

Wang, C. L., Li, D. F., Lu, Wang, Y. H., Lai, C. H. Influence of cultivating conditions on the α -galactosidase biosynthesis from a novel strain of *Penicillium sp.* in solid-state fermentation. Letters in Applied Microbiology. 39: 369-375. 2004.

Wariisshi, H., Valli, K., Gold, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*-kinetic mechanisms and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267: 23688. 1992.

Watanabe, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 237-241. 2001.

White, D.C. Sutton, S. D., Ringelberg, D. B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 301-306. 1996.

World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria. Vol. 71. Pentachlorophenol. Finland. 1987.

Zablotowicz R. M., Alber, T., Hall, J. C., Veldhuis, L., Locke, M. A., Hoagland, R. E., Lee, H. Trevors, J. T. Kloth, R. H. Duke, M. V. Bacterial transformation of the dinitroherbicides trifluralin and dinoseb by aromatic nitroreduction. IUPAC 9th International Congress Pestic. Chem. Book. of Abstracts 2. Abstr No. 6C.-030. 1998.

Zeddel, A., Majcherczyk, A., Hüttermann, A. Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicol Environ. Chem.* 40: 225-226. 1993.

ANEXOS**1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *A. rouxii* EN CULTIVO LÍQUIDO**

Como ya se había mencionado en la metodología el crecimiento de *A. rouxii* en cultivo sólido se estimaría con la glucosamina, para ello fue necesario realizar una fermentación líquida, la cual nos permitiría encontrar la relación entre la cantidad de glucosamina y biomasa seca. El muestreo se realizó cada 12 horas y los datos registrados hasta las 96 horas se muestran en el gráfico 15, el cual se muestra el crecimiento y cantidad de glucosamina formada.

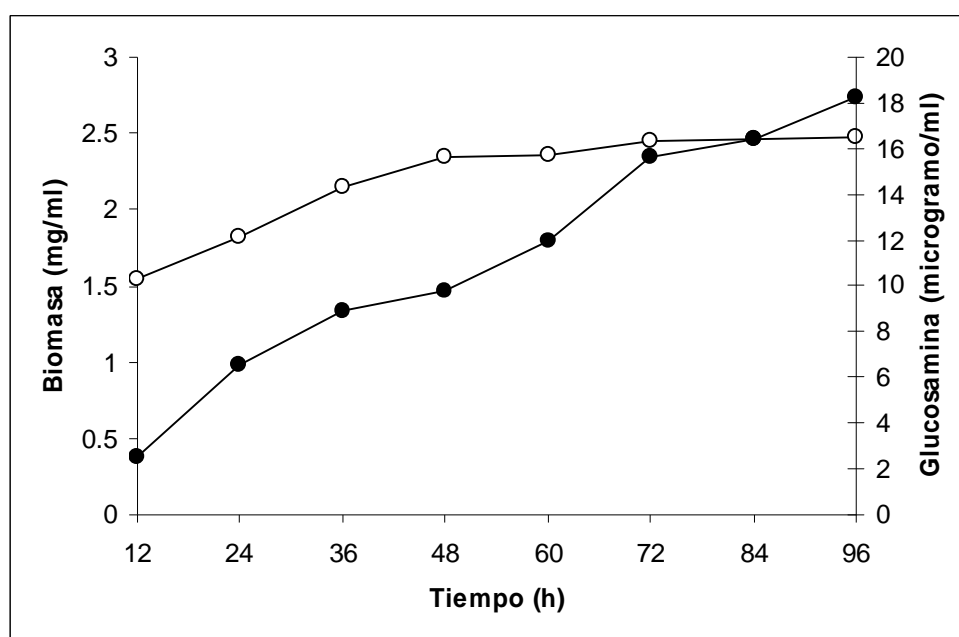


Figura 15. Crecimiento de *A. rouxii* y determinación de glucosamina en cultivo líquido. Círculos blancos indican biomasa y círculos negros glucosamina.

La mayor cantidad de micelio se presentó a al 84 h (2.46 mg ml⁻¹) y de glucosamina a las 96 h (microgramos ml⁻¹). Sin embargo se puede observar que el perfil de crecimiento tanto del hongo como de la glucosamina, es muy similar hasta las 60 horas. La cantidad de glucosamina aumentó de las 72 a 96 h. Esto podría deberse a que la glucosamina se acumula en la pared del hongo, probablemente a un engrosamiento de esta, aunque en el micelio ya no se observo aumentó.

Para obtener la concentración de glucosamina en microgramos ml⁻¹ se realizo una curva estándar (0-30 microgramos ml⁻¹) para la posterior determinación de la glucosamina formada en *A. rouxii* en los cultivos sólidos. La ecuación de la recta que se obtuvo con esas diluciones fue:

$$y = 0.0121x + 0.0151$$

con una R² de 0.9808.

La fermentación líquida nos permitió determinar la ecuación de la recta para calcular la cantidad de glucosamina en micelio, el grafico donde se obtuvo esta relación se muestra en la fig. 16, así como la ecuación obtenida:

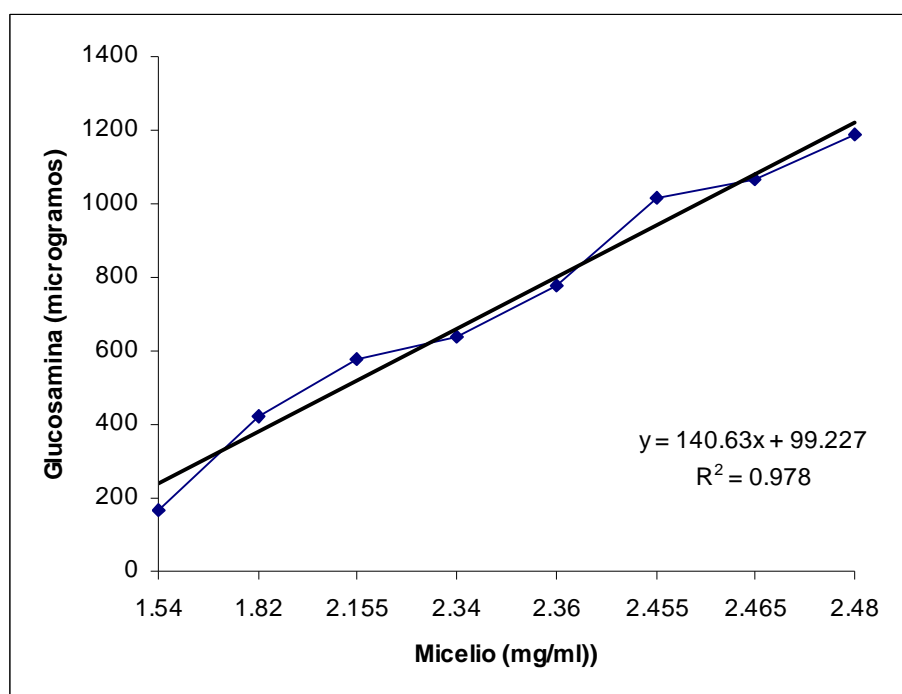


Figura 16. Determinación de glucosamina en fermentación líquida por mg de micelio de *A. rouxii*.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DEGRADACIÓN DE PCF CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TIROSINA.

El análisis de varianza de la degradación de PCF a las 72 horas de cultivo con las diferentes concentraciones de tirosina. Para el cual se empleó el programa NCSS. El α utilizado fue de 0.05.

Análisis de Varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F-Ratio	Prob nivel	Poder (Alfa=0.05)
A: Tratamientos	4	53.10694	13.27674	115.98	0.000000*	1.000000
S	19	2.175096	0.1144787			
Total (Adjusted)	23	55.28204				
Total	24					

Estos datos dan evidencia de que la degradación de PCF con *A. rouxii* es significativamente diferente con cada una de las concentraciones de tirosina empleadas. Ya que el nivel de significancia fue menor al empleado de 0.05.

Estas diferencias se muestran claramente mediante la prueba de Tukey-Kramer. Las concentraciones de 0.25 y 0.3 g L⁻¹ no difieren entre sí, aunque estas concentraciones si difieren de el resto de las concentraciones utilizadas de tirosina y del control sin tirosina. Las medias de degradación estimadas en 72 también se muestran en el análisis.

Prueba de Comparación Múltiple Tukey-Kramer

Variable respuesta: PCF residual (mg L⁻¹)
 termino: Concentraciones de tirosina (g L⁻¹)

Alfa=0.001 Error del termino=S DF=19 MSE=0.1144787 Valor crítico=6.818151

Grupo	Cantidad	Medias	Diferencia de Grupos
0.25 g L ⁻¹	5	0	0.2 g L ⁻¹ , 0.1 g L ⁻¹ , s/tir
0.3 g L ⁻¹	4	0	0.2 g L ⁻¹ , 0.1 g L ⁻¹ , s/tir
0.2 g L ⁻¹	5	1.155	0.25 g L ⁻¹ , 0.3 g L ⁻¹ , s/tir
0.1 g L ⁻¹	5	1.993	0.25 g L ⁻¹ , 0.3 g g L ⁻¹ , s/tir
Sin tir	5	3.992	0.25 g L ⁻¹ , 0.3 g L ⁻¹ , 0.2 g L ⁻¹ , 0.1 g L ⁻¹

En lo que se refiere a la producción de biomas se observa claramente que la tirosina no esta relaciona con el crecimiento del hongo, debido a que no se muestran diferencias entre estas. A este estudio también se le realizo el análisis de varianza así como la prueba de Tukey-Kramer. El nivel de significancia para estas pruebas también fue de 0.05.

Análisis de varianza

Fuente		Suma de	Media		Prob	Poder
Termino	DF	cuadrados	cuadrados	F-Ratio	nivel	(Alfa=0.05)
A: Concent de tir g L ⁻¹	4	4.61893	1.154732	3.11	0.047578*	0.670779
S	15	5.574325	0.3716217			
Total (Adjusted)	19	10.19326				
Total	20					

Prueba de Comparación Múltiple Tukey-Kramer

Variable respuesta: mg biomasa g⁻¹ msi

Termino: Concentración de tirosina g L⁻¹

Alfa=0.001 Error del termino=S DF=15 MSE=0.3716217 Valor crítico =7.253562

Grupo	Cantidad	Medias	Diferencia de grupos
0.1 g L ⁻¹	4	4.9425	
0.2 g L ⁻¹	4	5.6725	
0.25 g L ⁻¹	4	5.69	
Sin tir	4	6.055	
0.3 g L ⁻¹	4	6.3825	