



Instituto Politécnico Nacional

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada

CIBA-IPN Tlaxcala

Estudio de la Degradación de PAHs por Hongos no Ligninolíticos Aislados de Suelos Contaminados

M. C. Anaisell Reyes César
Tesisista

Diana V. Cortés Espinosa
Directora de Tesis



Dr. Juan Manuel González Prieto
Director de Tesis



Dr. Francisco José Fernández Perrino



Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino



Dra. María del Carmen Cruz López



Dra. M. Dolores Bibbins





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlax. siendo las 11:00 horas del día 25 del mes de noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA, Tlaxcala para examinar la tesis titulada:

Estudio de la Degradación de PAHs por Hongos no Ligninolíticos Aislados de Suelos Contaminados

Presentada por el alumno:

ANAISELL

Apellido paterno

REYES

Apellido materno

CESAR

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	2	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DRA. DIANA VERÓNICA CORTES ESPINOSA

DR. JUAN MANUEL GONZÁLEZ PRIETO

DRA. MARIA DEL CARMEN CRUZ LOPEZ

DR. ANGEL EDUARDO ABSALON CONSTANTINO

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS MARTINEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Iardizabal, Tlaxcala el día 12 del mes Diciembre del año 2013, el (la) que suscribe Anaisell Reyes César alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología Aplicada con número de registro B091424, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa y cede los derechos del trabajo intitulado “Estudio de la degradación de PAHs por hongos no ligninolíticos aislados de suelos contaminados”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección anacesar_464@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. C. Anaisell Reyes César

Nombre y firma

INDICE

1. Generalidades.....	1
1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	1
1.2 Suelos contaminados con PAHS.....	3
1.3 Biorremediación de suelos contaminados con PAHs.....	4
1.4 Microorganismos degradadores de PAHs.....	5
1.4.1 Bacterias.....	6
1.4.2 Hongos.....	8
1.5 Enzimas involucradas en la degradación de PAHs por Hongos ligninolíticos.....	12
1.5.1 Manganeso peroxidasa.....	12
1.5.2 Lignina peroxidasa.....	15
1.5.3 Peroxidasas Versátiles.....	19
2. Expresión Heteróloga de peroxidasas.....	22
3. Fermentación en estado sólido.....	23
4. Screening de lacasas, peroxidasas y peroxidasas versátiles.....	24
5. Identificación de hongos.....	28
6. Antecedentes.....	30
7. Justificación.....	32
8. Objetivos.....	33
9. Material y métodos.....	34
9.1 Aislamientos de hongos de suelos contaminados con crudo maya.....	34
9.2 Identificación hongos.....	35
9.2.1 Microcultivo.....	36
9.2.2 Secuencias ITS.....	36
9.3 Pruebas de tolerancia a PAHs.....	40
9.4 Screening de enzimas producidas por las cepas fúngicas tolerantes.....	41
9.5 Cultivo sólido.....	44
9.5.1 Estandarización de las condiciones de crecimiento en cultivo sólido de las cepas fúngicas seleccionadas.....	45
9.5.2 Remoción de Phe y Py en cultivo sólido por las cepas seleccionadas.....	47
9.6 Expresión heteróloga del gen vpl en la cepa fúngica seleccionada.....	51
9.6.1 Promotores.....	51
9.6.2 Genes de resistencia contra antifúngicos como marcadores de selección de transformantes.....	52
9.6.3 Métodos de transformación de hongos.....	54
10. Resultados y Discusión.....	61
10.1 Aislamiento de cepas fúngicas.....	82
10.2 Identificación de los aislados.....	83
10.3 Selección primaria de los aislados.....	96
10.4 Selección secundaria.....	101
10.4.1 Estandarización de las condiciones de crecimiento en cultivo sólido de las cepas seleccionadas..	102
10.4.2 Estandarización de las condiciones de extracción.....	104
10.4.3 Remoción de Phe y Py en cultivo sólido.....	105
10.5 Screening de enzimas oxidativas extracelulares en las cepas candidatas a mejora genética	111
10.6 Pruebas de sensibilidad a antifúngicos	114
10.7 Germinación de esporas en cultivo sumergido y superficial.....	115
10.8 Construcción del vector de expresión de vpl	121
10.9 Evaluación de transformantes	133
11. Conclusiones	137
12. Referencias.....	138

Índice de figuras

Fig. 1 Estructura química de los PAHs más estudiados (Haritash y Kaushik, 2009).....	2
Fig. 2 Estructura de Fenantreno.....	3
Fig 3. Estructura de sitios catalíticos de una peroxidasa versátil (PS1), lignina peroxidasa (Lip-H8) y manganeso peroxidasa MnP1.....	21
Fig. 4 Esquema de los genes par los rRNA 18S, 5.8S y 28S.....	37
Fig. 5 Temperaturas de algunos solventes bajo condiciones de MAE.....	49
Fig. 6 Vectores de expresión de genes de resistencia bajo promotores constitutivos.....	52
Fig.7 Suelo muestreado.....	61
Fig.8 Colonias fúngicas aisladas.....	62
Fig 9. Micrografías de cepas fúngicas aisladas.....	70
Fig. 10 Productos de PCR de secuencias ITS.....	71
Fig. 11 Árbol filogenético del genero <i>Aspergillus</i>	71
Fig.12. Matriz de identidad del género <i>Aspergillus</i>	72
Fig. 13 Árbol filigenético de los género <i>Neosartorya</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Scedosporium</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Neurospora</i>	73
Fig.14. Matriz de identidad de los géneros <i>Neosartorya</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Scedosporium</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Neurospora</i>	73
Fig 15. Frecuencia de los géneros aislados.....	74
Fig. 16. Prueba de tolerancia de cepas fúngicas aisladas.....	78
Fig 17. Velocidad de crecimiento radial en 1000 ppm de PAHs.....	79
Fig. 18 Tolerancia de las cepas seleccionadas a 2000 ppm de PAHs.....	80
Fig. 19 Crecimiento de <i>A. terreus</i> HCS2B sobre bagacillo de caña.....	82
Fig. 20 Crecimiento de <i>F. verticillioides</i> HCS5 sobre bagacillo de caña.....	82
Fig. 21 Crecimiento de <i>T. sepectabilis</i> HCS12 sobre bagacillo de caña.....	83
Fig. 22 Crecimiento de las cepas seleccionadas en cultivo sólido con suelo contaminado con PAHs.....	85
Fig. 23 Remoción de Phe y Py en cultivo sólido por las cepas seleccionadas.....	86
Fig. 24 Sensibilidad de las cepas seleccionadas a diferentes antifungicos.....	90
Fig. 25 Sensibilidad de <i>T. sepectabilis</i> HCS12 a diferentes concentraciones de higromicina.....	91
Fig. 26 Inhibición de esporas germinadas de <i>T. sepectabilis</i> HCS12 por glufocinato.....	91
Fig. 27 Germinación de <i>A. terreus</i> HCS2B en cultivo superficial.....	92
Fig. 28 Germinación de <i>T. sepectabilis</i> HCS12 en cultivo superficial.....	93
Fig. 29 Germinación de <i>A. terreus</i> HCS2B en cultivo sumergido.....	93
Fig. 30 Germinación de <i>T. sepectabilis</i> HCS12 en cultivo sumergido.....	94
Fig. 31 Selección de transformantes de <i>A. terreus</i> HCS2B en carboxina.....	95
Fig. 32 Selección de transformantes de <i>T. sepectabilis</i> HCS12 en carboxina.....	96

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físicoquímicas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	1
Tabla 2. Ezimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca envueltos en la degradación de xenobióticos.....	10
Tabla 3. Dímeros y Colorantes Fenólicos y no Fenólicos.....	26
Tabla 4. Diseño experimental de aislamiento de hongos de suelo contaminado con hidrocarburos.....	35
Tabla 5. Diseño experimental para el screening de peroxidasas.....	43
Tabla 6. Medio Dhouib.....	44
Tabla 7. Mezcla de reacción para LiP y MnP.....	44
Tabla 8. Diseño experimental para la selección de la fuente primaria de nutrientes.....	46
Tabla 9. Composición de medios para cultivo sólido.....	46
Tabla 10. Diseño experimental para la evaluación de remoción de PAHs por las cepas seleccionadas.....	48
Tabla 11. Eficiencia de extracción por MAE de diferentes analitos con diferentes solventes.....	50
Tabla 12. Eficiencia de extracción con diferentes solventes.....	50
Tabla 13. Diseño experimental de estandarización de condiciones de extracción por MAE.....	51
Tabla 14. Diseño experimental del análisis de sensibilidad de las cepas seleccionadas contra Antifúngico.....	53
Tabla 15. Diseño experimental de germinación de esporas en cultivo sumergido.....	55
Tabla 16. Diseño experimental de transformación por electroporación.....	58
Tabla 17. Diseño experimental de germinación de esporas en cultivo superficial.....	58
Tabla 18. Diseño experimental de transformación de <i>A. terreus</i> por biobalística.....	59
Tabla 19. Diseño experimental de transformación de <i>T. spectabilis</i> por biobalística.....	60
Tabla 20. Eficiencia de extracción.....	84

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos que consisten de dos o más anillos bencénicos agrupados en una estructura angular o lineal (Fernandez et al., 1992; Haritash A.K., Kaushik C.P., (2009). Estos contaminantes pueden ser producidos de forma natural en las erupciones volcánicas, los incendios forestales e incluso los exudados de arboles. Sin embargo la principal fuente de PAHs es antropogénica en la cual resalta las actividades relacionadas con la extracción, el procesamiento o el transporte del petróleo (Martínková, 2009; Kaushik and Haritash, 2006).

Aunque los PAHs se hallan en el aire y estuarios su depósito final es el suelo (Patnaik, 1999). La razón de la importancia que han merecido estos contaminantes es su alto potencial de acumulación en humanos (IARC, 1983) y debido a que algunos de ellos, especialmente aquellos de cuatro o más anillos aromáticos están confirmados como agentes carcinogénicos (U.S. EPA 1987).

En este trabajo se estudio la técnica de biorremediación como una opción factible para la remoción de PAHs en suelos contaminados, para lo cual se aislaron nueve cepas fúngicas de un suelo contaminado con crudo Maya, estas cepas fueron seleccionadas en base a su capacidad para crecer y usar petróleo y PAHs como fuente de carbono, para su aplicación en la remoción de PAHs de suelos contaminados. Las cepas fúngicas se identificaron por la amplificación mediante PCR de la secuencia ITS y mediante técnicas microbiológicas, y los resultados arrojaron que pertenecían a los generos de *Fusarium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Penicillium*, *Neosartorya* y *Talaromyces*. Una selección primaria de los hongos se llevo a cabo considerando su tolerancia a diferentes concentraciones de PAHs por cada cepa la cual se midio por la extensión radial que mostraron en presencia del contaminante. Las cepas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) de 200 a 1,000 mg de PAHs l^{-1} . Posteriormente se realizo una selección secundaria de *Aspergillus terreus*, *Talaromyces spectabilis*, y *Fusarium sp.* basados en su tolerancia a 2,000 mg de una mezcla de fenantreno y pyreno por kg de suelo en cultivo sólido por 2 semanas. El porcentaje

de remoción de PAHs obtenido por las tres cepas fue de aproximadamente un 21% de mezcla de PAHs.

Las cepas fúngicas *Aspergillus terreus* y *Talaromyces spectabilis* fueron sometidas a una mejora genética mediante la expresión heterológica del gen *vpl* que codifica para una peroxidasa versátil, enzima capaz producir en los PAHs una completa mineralización. Ambos microorganismos rindieron colonias transformadas tanto por biobalística como por electroporación pero las más eficientes pertenecieron a *Talaromyces spectabilis* cuya clona *T8E* fue capaz de producir la enzima en cultivo sumergido y superficial.

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are compounds consisting of two or more benzene rings grouped in linear or angular structure (Fernandez et al., 1992; Haritash A.K., Kaushik C.P., (2009). Such contaminants may be produced by natural events such as forest fires, volcanic eruptions and tree exudates. However, the main source of PAHs is anthropogenic in which highlight the activities related to the extraction, processing or transportation of oil (Martínková, 2009; Kaushik and Haritash, 2006).

PAHs are ubiquitous but due to its low aqueous solubility their final deposit is the soil (Patnaik, 1999). The reasons of the focus on PAHs are that have a high accumulation potential (IARC, 1983) and some of them especially those of four or more aromatic rings are confirmed carcinogens (U.S. EPA 1987).

Although many efforts have been made to generate methods to accelerate the degradation of PAHs contained in the soil, most are expensive and inefficient methods for whatever they get is to move the contaminant from one phase to another (MacGillivray and Shiaris, 1994). Unlike, the biological methods like bioaugmentation (Vidali, 2001) and biostimulation can provide good systems for bioremediation of soils contaminated with highly recalcitrant compounds. Bioremediation is the transformation of xenobiotic compounds by microbial degradation to less risky forms or totally safe with minimal investment of chemicals, energy, and time (Alexander, 1999). In this type of systems have been used both gram positive and gram-negative bacteria (Martínková, 2009) (van der Geize y col., 2004; Larkin y col., 2005). But are fungi which to date have shown greater benefits both for its enzyme system and its physiology (Šašek, 2003) (Baldrian, 2003).

Nine native non-ligninolytic fungal strains were isolated from Maya crude oil-contaminated soil and selected based on their ability to grow and use crude oil and several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as carbon source, for their application to PAH removal in soil. The fungi were identified by PCR amplification of intergenic transcribed sequences regions and microbiological techniques, and results showed them to be part of the genera *Fusarium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Penicillium*, *Neosartorya* and *Talaromyces*.

A primary selection of fungi was made in minimal medium plates, considering the tolerance to different concentrations of PAHs for each strain. The radial extension rate exhibited significant differences ($p < 0.05$) from 200 to 1,000 mg of PAHs mixture l^{-1} . A secondary selection of *Aspergillus terreus*, *Talaromyces spectabilis*, and *Fusarium sp.* was achieved based on their tolerance to 2,000 mg of a mixture

of Phenanthrene and Pyrene kg^{-1} of soil in a solid-state microcosm system for 2 weeks. The percentage of PAH removal obtained by the three strains was approximately 21 % of the mixture.

1. GENERALIDADES

1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos formados por dos o más anillos bencénicos unidos en forma lineal o angular (Fernandez y col., 1992). Físicamente se encuentran como sólidos incoloros, blanquecinos o amarillentos y entre sus principales propiedades físicoquímicas resaltan su baja solubilidad acuosa y alto punto de fusión. (Tabla 1) (Clar, 1964; Patnaik, 1999).

Tabla1. Propiedades físicoquímicas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)

S. No.	Nombre	F	P. E. (°C) ^a	P. F (°C) ^a	P.V. (Pa a 25 °C)	Solubilidad ac. (mg/l) ^b
1	Benzo [k] fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	480	215.7	5.2x10 ⁻⁸	-
2	Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	342	216.4	1x10 ⁻³	0.015
3	Benzo [b] fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	481	168.3	6.7x10 ⁻⁵	-
4	Benzo(e)pireno	C ₂₀ H ₁₂	493	178.7	4x10 ⁻⁷	-
5	Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	375	108.8	1.2x10 ⁻³	0.25
6	Naftaleno	C ₁₀ H ₈	218	80.2	11	30
7	Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	340	100.5	2x10 ⁻²	1-2
8	Benso[ghi]perileno	C ₂₂ H ₁₂	500	277	6x10 ⁻⁸	-
9	Pireno	C ₁₆ H ₁₀	150.4	393	6x10 ⁻⁴	0.12-0.18

F. Fórmula

P.E. Punto de ebullición

P.F. Punto de fusión

P.V. Presión de vapor

Ac. Acuosa

Los PAHs surgen de fuentes naturales así como antropogénicas. Los incendios forestales, erupciones volcánicas e incluso exudados de árboles son consideradas como fuentes naturales que pueden dar origen a la presencia de PAHs en la biosfera. Estos contaminantes también pueden producirse por la descomposición de grandes cantidades de la lignina, un polímero fenólico complejo, de plantas en decadencia. La segunda fuente de PAHs y quizá la más significativa es de tipo antropogénico, en la que destacan actividades relacionadas a la extracción, el procesamiento y el transporte del petróleo así como diversos procesos de las industrias químicas que incluyen la oxidación de combustibles fósiles (Martínková, 2009) como el carbón y residuos de aceite (Kaushik y Haritash, 2006). Por último y no menos importante la incineración de residuos municipales también puede generar PAHs los cuales pueden formarse durante la descomposición térmica de compuestos orgánicos y su subsecuente recombinación, la combustión incompleta a altas temperaturas (500-800°C) o el sometimiento por largos periodos de tiempo de material orgánico a temperaturas bajas (100-300°C).

Los PAHs son contaminantes ubicuos, es decir, que se encuentran tanto en el aire como en estuarios pero por su baja solubilidad su depósito final es el suelo. Son tóxicos, mutagénicos y quizá fueron los primeros

carcinógenos ambientales reconocidos (IARC, 1983). Este tipo de compuestos poseen un alto potencial de bioacumulación, no se degradan fácilmente bajo condiciones naturales y su persistencia aumenta con el peso molecular, por lo que han ganado atención significativa. Una vez en el medio ambiente los PAHs pueden sufrir volatilización, foto-oxidación, oxidación química o lixiviación pero lo más probable es que por su baja solubilidad simplemente queden adsorbidos sobre las partículas del suelo y, posteriormente, si se dan las condiciones necesarias, sean blanco de degradación microbiana (Wild, K.C. Jones, 1995). Mucho tiempo se confió en que los riesgos asociados con los PAHs podían superarse por el uso de métodos convencionales como la remoción de los contaminantes por extracción o el aislamiento del suelo contaminado. Sin embargo todas estas técnicas incluyen la excavación de grandes cantidades de suelo contaminados y su contención por un largo periodo de tiempo para una posterior incineración, por lo que resultan tecnologías caras, y además ineficientes pues solo consiguen la transferencia del contaminante de una fase a otra debido a que los PAHs poseen una alta estabilidad relativa por la disposición de los anillos (Blumer, 1976; MacGillivray and Shiaris, 1994) (fig. 1).

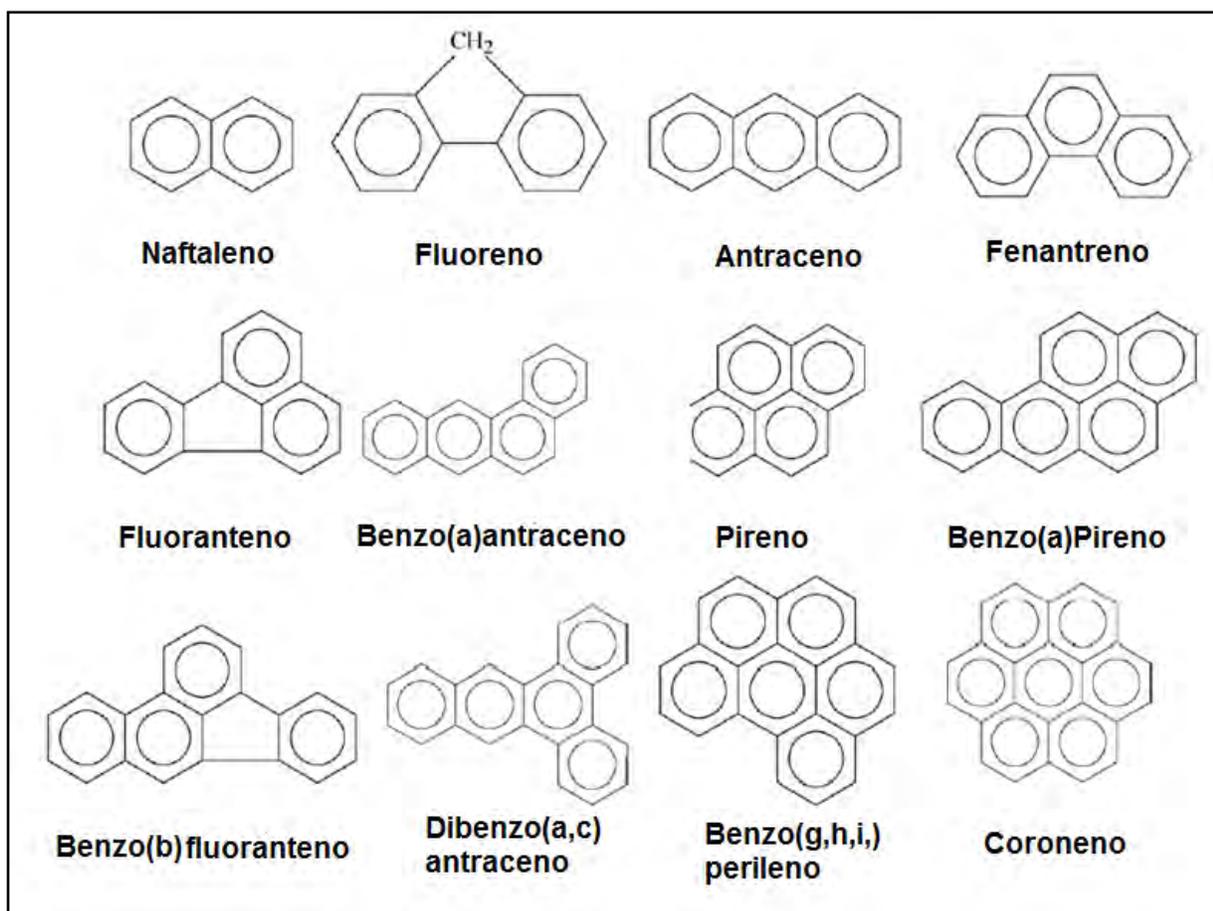


Fig. 1 Estructura química de los PAHs más estudiados (Haritash y Kaushik, 2009).

De los PAHs, el fenantreno es el más simple que tiene las regiones K y bahía y por eso es empleado como modelo para estudiar la degradación de los PAHs. La región bahía se forma entre los carbonos 4 y 5, mientras que la región K se forma entre los carbonos 9 y 10 (Fig. 2). La importancia de estas regiones estriba en el hecho de que el ataque microbiológico es específico en alguna de ellas dependiendo del microorganismo y la enzima producida. Aunque el fenantreno no ha sido clasificado como cancerígeno o mutagénico, sí se ha demostrado que es tóxico para algunas especies marinas. La concentración letal de fenantreno reportada para un microcrustáceo es de 0.245 mg/mL (Traczewska, 2000).

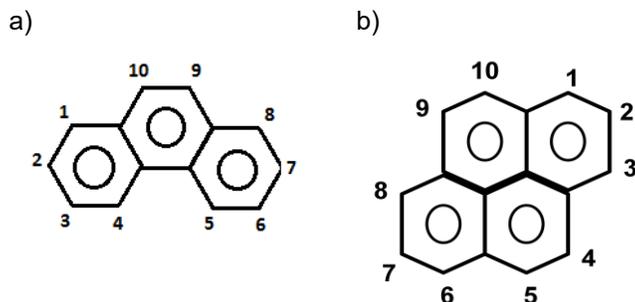


Fig. 2 Estructura de a) Fenantreno y b) Pireno

El pireno ha sido usado en estudios de metabolismo como modelo para examinar la degradación biológica. Aunque no se ha comprobado que el pireno sea genotóxico sirve como compuesto modelo para medir el enlace a DNA puesto que la estructura del pireno se encuentra en PAHs que si tienen efectos carcinogénicos demostrados (Pothuluri y Cerniglia). Las regiones "K" comprendidas entre los carbonos 1,2; 4,5; 6,7; 7,8 y 9,10 son vulnerables a la oxidación enzimática

1.2 Suelos contaminados con PAHs

El suelo es la parte superficial de la corteza terrestre. Contiene grava, arena, arcilla, agua y elementos nutritivos que los seres vivos utilizan, por lo que se considera una zona biológicamente activa. En el suelo se apoyan y nutren las plantas en su crecimiento y condiciona, por tanto, todo el desarrollo del ecosistema. Sobre el suelo también se desarrollan actividades humanas tanto laborales, de vivienda y recreativas. Por esta razón la contaminación del suelo por PAHs puede afectar directamente al ser humano. Aunque la intoxicación por PAHs puede darse a través de la ingesta de vegetales producidos en suelos contaminados con PAHs, la mayor absorción de PAHs en el ser humano y otros mamíferos se da por inhalación y contacto dérmico.

La exposición del ser humano a concentraciones altas de PAHs se genera mayoritariamente por razones laborales en pozos petroleros, refinerías o cualquier industria que involucre el procesamiento del petróleo. Por

citar algunos ejemplos de sitios altamente contaminados con PAHs puede mencionarse un estudio realizado sobre creosote en España donde se determinó la presencia de ~8,000 mg de hidrocarburos totales del petróleo [TPH] kg^{-1} de suelo de los cuales incluían 2,700 mg de PAH kg^{-1} de suelo Viñas y col., (2005). En otro estudio reciente encontró que las concentraciones de 16 PAHs en algunos suelos en la región Delta del Río Yangtze del este de China alcanza una concentración de aproximadamente 10,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de suelo, con PAHs de 3, 4 y 5(+6) anillos en porcentajes de 8%, 57% y 35% respectivamente (Teng Y y col., 2010). En México, no solo la zona que comprende la extracción y procesamiento de petróleo están seriamente afectadas por derrames sino también zonas de líneas de transporte tanto de petróleo crudo como de productos obtenidos de la refinación. Esto hace que el área de suelos contaminados incremente cuando existen accidentes en los conductos o fugas por toma clandestina.

Actualmente el rescate de suelos altamente contaminados con hidrocarburos está cobrando la importancia que requiere ya sea por salud pública o para recuperar la plusvalía de predios afectados y la principal herramienta con que se cuenta para lograrlo es la biorremediación, la cual es una técnica para transformar xenobióticos a formas menos riesgosas o totalmente inocuas con la mínima inversión de químicos, energía, y tiempo (Providenti y Trevors, 1993; Alexander, 1999) mediante la degradación microbiana (Bumpus, 1989; Ward y col, 2003).

1.3 Biorremediación de suelos contaminados con PAHs

La *bioremediación* es una alternativa que ofrece la posibilidad para destruir contaminantes tóxicos usando una actividad biológica natural. Por definición, la biorremediación es el uso de organismos vivos principalmente microorganismos, para degradar contaminantes ambientales a formas menos tóxicas. Utiliza bacterias, hongos o plantas para degradar o detoxificar sustancias peligrosas para la salud humana y/o el ambiente (Atlas, 1981). Dentro de la biorremediación de suelos contaminados con PAHs existen dos tipos de tratamiento usados comúnmente llamados bioaumentación y bioestimulación. La bioaumentación se da por inoculación con cepas degradadoras de PAHs en donde los microorganismos pueden ser nativos del área contaminada o pueden ser aislados de algún otro lugar y transportados al sitio contaminado (Vidali, 2001). La bioestimulación se da por suplementación con fuentes de carbono u otros nutrientes para estimular la microbiota nativa e incrementar la actividad catabólica durante la biorremediación (Mohan y col., 2009). La bioaumentación es usada con frecuencia en combinación con la bioestimulación, especialmente cuando la microbiota nativa del suelo no muestra la habilidad para degradar eficientemente PAHs de alto peso molecular. La remediación por efecto de la bioaumentación depende tanto de factores abióticos (pH del suelo, agua y aire, temperatura, y la disponibilidad de fuentes de carbono primarias y secundarias que en este caso serían los PAHs) y de factores bióticos como lo es principalmente la capacidad degradativa de las cepas microbianas introducidas (Semple y col., 2006).

Los compuestos contaminantes son transformados por los organismos vivos a través de reacciones que toman lugar como parte de su proceso metabólico para alcanzar finalmente la biodegradación lo cual, con frecuencia, es un resultado de la acción de múltiples organismos. Las técnicas de Bioremediación son con frecuencia más económicas que los tratamientos térmicos y físico-químicos como la incineración (Cho y col., 2000, Korda y col., 1997).

Los procesos de Bioremediación han sido clasificados en tres amplias categorías, de acuerdo al lugar y a las condiciones de contención del suelo: *in situ*, *ad situ*, y *ex situ*. La segunda y tercer clase de los procesos son útiles para la remediación de lodos, suelos o sedimentos contaminados con altas concentraciones de contaminantes recalcitrantes (Zhang y col., 2000), por ejemplo PAHs (Pinelli y col., 1997). Dentro de las técnicas de biorremediación *ad situ* y *ex situ*, los biorreactores de lodos son uno de los más importantes. El tratamiento de suelo y sedimentos en el biorreactor de lodos ha llegado a ser una de las mejores opciones para la biorremediación de suelos contaminados por residuos recalcitrantes bajo condiciones ambientales controladas (Mohan, 2006).

Las características interesantes y distintivas de los biorreactores de lodos son que el suelo es tratado en suspensión acuosa, típicamente de 10 a 30% p/v y que está provisto de un mezclador mecánico o neumático. Estas características, a su vez, dan lugar a varias ventajas del proceso, *inter alia*: (i) el incremento de la velocidad de transferencia de masa y con ello el aumento de contacto microorganismos/contaminante/nutrientes; (ii) el incremento de la velocidad de biodegradación del contaminante comparado a la biorremediación *in situ* o al biotratamiento en fase sólida *ad situ*; (iii) asociada al punto (i) y al punto (ii), se pueden alcanzar tiempos significativamente más cortos; (iv) la posibilidad de usar diferentes aceptores de electrones (O_2 , SO_4^{2-} , CO_2 , NO_3^-); (v) control y optimización de muchos parámetros ambientales como la temperatura, pH, etc.; (vi) uso efectivo de bioestimulación y bioaumentación; (vii) incremento de la desorción del contaminante y la disponibilidad a través de la adición de surfactantes y solventes (Robles-González, 2008). Sin embargo, los biorreactores de lodos también tiene algunas desventajas, todas ellas relacionadas a los requerimientos de excavación de suelos, contención y acondicionamiento de grandes cantidades de suelo por periodos prolongados de tiempo, y la construcción/operación del bioreactor que con frecuencia incrementan los costos comparados con las técnicas más simples de bioremediación (Cookson, 1995). Por lo que actualmente se está profundizando sobre las técnicas de biorremediación *in situ*.

1.4 Microorganismos Degradadores de PAHs

Se sabe que los microorganismos poseen actividad catabólica en biorremediación (Dua y col., 2002). Los microorganismos degradadores de PAHs pueden ser algas, bacterias y hongos los cuales pueden llevar a cabo

la descomposición de los compuestos orgánicos a través de biotransformación en metabolitos menos complejos, y a través de la mineralización en compuestos inorgánicos, H₂O, CO₂ (aerobio) o CH₄ (anaerobio).

El grado y la velocidad de biodegradación dependen de las condiciones ambientales, el número y tipo de los microorganismos, la naturaleza y la estructura química del compuesto químico. Por lo tanto, para idear un sistema de bioremediación se tiene que tomar en cuenta un gran número de factores como pH, temperatura, transferencia de oxígeno, población microbiana, el grado de aclimatación, la accesibilidad de nutrientes, la estructura química del compuesto y las propiedades de transporte celular (Singh y Ward, 2004). La capacidad de degradación de compuestos aromáticos naturales (p.e., los aminoácidos y aminos aromáticos, benzoatos hidroxilados y ácidos fenilcarboxílicos) se encuentran ampliamente entre especies microbianas de las cuales las más estudiados por su habilidad para degradar xenobióticos incluyendo PAHs han sido las bacterias y hongos.

1.4.1 Bacterias

Las bacterias son una clase de microorganismos activamente envueltos en la degradación de contaminantes orgánicos de sitios contaminados. Actualmente se conocen cepas de bacterias que tienen la capacidad de remover PAHs las cuales han sido aisladas de suelos contaminados o sedimentos de lugares con descargas prolongadas de residuos petroquímicos. Los compuestos xenobióticos aromáticos son degradados por un grupo pequeño de bacterias, particularmente por cepas de bacterias Gram-negativas de *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia* y *Burkholderia* y la Gram-positiva *Rhodococcus* (Martínková, 2009). Varias cepas de *Rhodococcus* degradan benceno y sus derivados (tolueno, etilbenceno, xileno, bifenilos), compuestos aromáticos policíclicos y heterocíclicos, compuestos fenólicos, ácidos aromáticos, aromáticos halogenados, incluyendo bifenilos policlorados (PCBs). También se ha observado la degradación de amino y nitro-derivados de compuestos aromáticos (p. e., anilina y nitrofenol), éteres y pesticidas, carbón desulfurizado y otros productos del petróleo (van der Geize y col., 2004; Larkin y col., 2005). Muchos de estos sustratos son moléculas sintéticas complejas con estabilidad y toxicidad remarcada, otros como los compuestos aromáticos y nitrilos son contaminantes ambientales ampliamente dispersados y muchos de ellos están en la Lista de Contaminantes Prioritarios de la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA, 1996) y la Lista de Prioridad de Sustancias Peligrosas de la Agencia de Registro para Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR, 1997).

Para mostrar un poco del panorama de biodegradación de PAHs por bacterias se citan aquí algunos trabajos como el realizado por Ye y col., (1996) donde reportan la degradación del Benzo(a)pireno (BaP) el cual es considerado como el más carcinogénico y tóxico de los PAHs. Esta degradación se llevo a cabo por *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 con una fuente alterna de carbono pero solo observó una disminución de un 5% en la concentración de BaP después de 168 h de incubación. Romero y col., (1998) aislaron *Pseudomonas aeruginosa* de una fuente altamente contaminada por una refinería de petróleo. Las especies se

encontraron activamente crecientes sobre altas dosis de fenantreno con remoción completa del contaminante en un periodo de 30 días. Rehmann y col., (1998) aislaron un *Mycobacterium spp.*, KR2 de un suelo contaminado de una planta de gas, la cual era capaz de utilizar pireno como única fuente de carbono y energía. El aislado metabolizó hasta el 60% de pireno adicionado (0.5 mg ml^{-1}) en 8 días a 20°C . Yuan y col., (2002) aislaron seis cepas de bacterias Gram-negativas entre las que se encontraba *Pseudomonas fluorescens* y *Haemophilus spp* de un sitio contaminado con residuos petroquímicos que tenían la capacidad de degradar de 70-100% acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno en un periodo de 40 días de un tratamiento inicial lo cual comprueba que las bacterias muestran una degradación limitada a PAHs de bajo peso molecular.

Viñas y col., (2005) usaron una serie de tratamientos de bioremediación en experimentos en microcosmos con suelos altamente contaminados con $2,700 \text{ mg de PAH kg}^{-1}$ de suelo y comprobaron que la aireación y el contenido de agua es un factor clave en la actividad de biodegradación, y definieron la capacidad de retención de agua (WHC, por sus siglas en inglés) en un 40% como el contenido de agua óptimo para los experimentos del suelo en microcosmos. Aunque el depósito final de los PAHs es el suelo o partículas sólidas, actualmente está surgiendo el interés sobre la contaminación con PAHs de ambientes acuáticos como sedimentos de manglares y arenas de estuarios que están estrechamente relacionados a actividades humanas. Se ha encontrado que las bacterias aisladas de los sedimentos de manglares presentan la capacidad de degradar del 42-78% fenantreno con diferentes potenciales de degradación dependiendo de diferentes sedimentos (Tam y col., 2002). De acuerdo a la secuencia del genoma de *R. jostii* RHA1 se lograron identificar 26 rutas periféricas y 8 rutas centrales las cuales están envueltas en el catabolismo de compuestos aromáticos (McLeod y col., 2006). Dentro de la ruta periférica, los compuestos aromáticos están modificados en un número de etapas que incluyen la acción de monooxigenasas o dioxigenasas dando como resultado la formación de un anillo bencénico dihidroxilado.

Los resultados antes expuestos nos muestran que, aunque las bacterias pueden ofrecer sistemas alternativos en la biorremediación debido a que metabolizan aeróbicamente un amplio rango de compuestos aromáticos naturales y xenobióticos a través de rutas superiores o periféricas, dan como resultado un número de intermediarios centrales que con dificultad son completamente degradados a través de vías centrales para proporcionar intermediarios del ciclo del citrato (Harwood y Parales, 1996), lo cual nos dice que el sistema enzimático que poseen las bacterias sigue una ruta que en la mayoría de los casos no finaliza con una mineralización, es decir, con la degradación del xenobiótico a CO_2 y H_2O . Inclusive la ruta de degradación seguida por este tipo de microorganismos exhibe la producción de intermediarios si no más tóxicos sí mucho más reactivos que los iniciales adquiriendo una mayor solubilidad y por ende una mayor migración a través de sistemas acuosos con lo que pueden expandir el área de contaminación. Además por la naturaleza del sistema de producción enzimática, las bacterias no pueden exportar las proteínas producidas sino que recurren a otros sistemas como la endocitosis para obtener nutrientes que están alrededor de la célula. Es por eso que solo pueden degradar compuestos de bajo peso molecular pues es imposible que moléculas más grandes atraviesen la pared celular.

A pesar de que las bacterias representan sistemas alternativos en la biorremediación, es bien conocido que la mayoría de los microorganismos en muestras ambientales no pueden ser cultivados actualmente en medios de laboratorio, los cuales se enfocan al crecimiento de microorganismos específicos (Amann y col., 1995, Torsvik y col., 2002) y aunque se ha hecho un gran esfuerzo de investigación sobre el proceso degradativo de PAHs por bacterias su aplicación frecuentemente falla debido a la baja capacidad de las cepas para sobrevivir en competencia con la microbiota autóctona en las condiciones de remediación *in situ* (Cases y de Lorenzo, 2005). La mineralización de PAHs por bacterias solo ha sido reportada para aquellos de 2 y 3 anillos aromáticos por lo que se ha puesto atención especial en otros sistemas de degradación microbianos como los sostenidos por el metabolismo de hongos el cual ha sido ampliamente examinado por el potencial de detoxificación de PAHs de cuatro y más anillos aromáticos (Bumpus, 1989)

1.4.2 Hongos

Los sitios contaminados por PAHs se han caracterizado por llevar años sin ningún tratamiento y con el tiempo, los químicos son secuestrados dentro de la matriz del suelo o son adsorbidos más fuertemente sobre las partículas del suelo, haciéndolos no disponibles para la degradación microbiana (Andreoni y col., 2007). En casos de tal dificultad, el uso de hongos filamentosos pueden dar algunas ventajas sobre la bioaugmentación bacteriana (Šašek, 2003) debido a que la morfología de los hongos les permite alcanzar el contaminante, por muy inaccesible que este en la matriz sólida, gracias al desarrollo de hifas. Los suelos contaminados con compuestos recalcitrantes orgánicos con frecuencia pueden contener también metales pesados (Bouchez y col., 2000). Los hongos presentan una alta habilidad para inmovilizar metales tóxicos ya sea por la formación de un oxalato metálico, biosorción, o quelación sobre polímeros similares a la melanina (Baldrian, 2003).

Los hongos filamentosos no ligninolíticos están ampliamente distribuidos en suelo y algunos de ellos tienen la capacidad de remover compuestos xenobióticos. El primer paso en el metabolismo de los PAHs por hongos no ligninolíticos es la oxidación del anillo aromático por acción de una monooxigenasa, produciendo un óxido de areno inestable. El complejo enzimático que cataliza la formación de óxidos de areno contiene una enzima inducible unida a la membrana plasmática, citocromo P450 (Omura, 1999). Esta ruta es similar al metabolismo de PAHs por mamíferos. En comparación con la oxidación del anillo aromático por enzimas dioxigenasas de las bacterias que forman los cis-dihidrodióles, las monooxigenasas incorporan solo un átomo de oxígeno molecular al anillo para formar el óxido de areno. Inmediatamente después, la enzima epóxido hidrolasa cataliza la adición de una molécula de agua al óxido de areno produciendo trans-hidrodióles los cuales son mucho más reactivos que los compuestos iniciales.

Capotorti y col., (2004) reportan el aislamiento de *Aspergillus terreus* de un suelo contaminado con PAHs, el cual es capaz de metabolizar pireno y benzo(a)pireno a los metabolitos correspondientes hidroxilados y sulfato. La formación del metabolito 1-pirenilsulfato sugiere un mecanismo de oxidación por una monooxigenasa citocromo

P-450 seguida por una conjugación con un ión sulfato. La hipótesis de cómo es que se lleva a cabo esta biodegradación la misma que se tiene para la depolimerización inicial de la lignina donde las peroxidasas extracelulares liberan compuestos que son internados y posteriormente degradados por diversas enzimas intracelulares, incluyendo las monooxigenasas P450. Otros estudios han mostrado también la habilidad de *A. terreus* para degradar un amplio espectro de contaminantes aromáticos, alicíclicos, y alifáticos bajo condiciones limitadas de nutrientes (ligninolíticos) y condiciones completas de nutrientes (no ligninolíticas).

Otras rutas metabólicas de PAHs, presentes en los hongos no ligninolíticos, es la hidroxilación también iniciada por monooxigenasa citocromo P-450 a través de una secuencia de reacciones similares a las reportadas en el metabolismo de estos hidrocarburos llevado a cabo por mamíferos (Cerniglia 1981). Esta ruta es compartida por muchos micromicetos no ligninolíticos, aislados de suelos contaminados, que podrían tener un potencial en la degradación de PAHs (Ravelet et al. 2000).

Las monooxigenasas citocromo P450 ("P450s") constituyen una gran familia de proteínas hemo-tiolato ampliamente distribuidas en las diferentes formas de vida incluyendo procariotes (archaea, bacteria), eucariotes inferiores (hongos, insectos), y eucariotes superiores (plantas y animales). Las P450s juegan un papel muy importante en el metabolismo de una amplia variedad de compuestos endógenos y xenobióticos. La actual nomenclatura de P450 (Nelson y col., 1996) está basada en la evolución divergente de la superfamilia P450 sobre la base de la homología de secuencia, todos los P450s pueden ser categorizados en dos clases principales, B ('bacteriano') y E ('eucariótico') (Gotoh, 1993).

Los hongos que degradan lignina llamados "hongos ligninolíticos" también tienen la capacidad de llevar a cabo el rompimiento de un amplio rango de contaminantes orgánicos en suelos debido a la baja especificidad de sustrato de su maquinaria enzimática degradativa (Durán y Esposito, 2000).

La lignina es un polímero fenilpropanoide sintetizado a partir de los alcoholes fenólicos coniferil, sinapil y p-cumaril (Freudenberg, 1968). La condensación de los radicales libres de estos precursores, iniciada por las peroxidasas de la pared celular de las plantas, resulta en la formación de un polímero heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo, aleatorio y altamente ramificado con por lo menos 12 diferentes tipos de enlaces tales como éter de arilo y carbono-carbono conectando el núcleo aromático, los cuales no están sujetos a hidrólisis enzimática. La lignina, el tercer polímero heterogéneo principal en los residuos ligninocelulósicos, actúa como una barrera debido a que se enlaza a la hemicelulosa y celulosa evitando la penetración de enzimas ligninocelulíticas al interior de la estructura de las plantas. Por lo que no es sorprendente, que la lignina sea el componente más recalcitrante del material ligninocelulósico (Sanchez, 2009) cuya estructura única requiere una depolimerización por mecanismos oxidativos extracelulares llevada a cabo por muchos microorganismos (Crawford, 1981) como los hongos que degradan celulosa y otras fibras de la pared celular de las plantas.

Los hongos contribuyen significativamente a la degradación de los residuos lignocelulosicos en la naturaleza debido a la producción de diferentes enzimas lignocelulíticas. En 1976, mas de 14,000 especies fúngicas con la capacidad de degradar celulosa ya se habían aislado, pero solo algunas de ellas se sometieron a estudios más profundos (Mandels y Sternberg, 1976). La mayoría de los hongos producen varias enzimas en grandes cantidades las cuales son liberadas en el ambiente y actúan en una manera sinérgica. En cuanto a su mecanismo de reacción, se cree que la lignina es primero depolimerizada oxidativamente fuera de la hifa fúngica por la acción combinada de lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, especies oxígeno reactivas, y metabolitos secundarios secretados, después de lo cual los fragmentos de lignina resultantes son internados y mineralizados intracelularmente (Kersten y Cullen, 2007).

El grupo de hongos productores de enzimas lignocelulíticas es muy amplio, e incluye especies desde los ascomicetos (e.g. *T. reesei*), hongos de pudrición oscura (e.g. *Fomitopsis palustris*) y los basidiomicetos incluyendo los hongos de pudrición blanca (e.g. *P. chrysosporium*). Los hongos de pudrición blanca han destacado entre todos (Tabla 2) debido a que su sistema degradativo de lignina es oxidativo y no es específico. Por otra parte, la lignina contiene una variedad de enlaces que están comúnmente presentes en contaminantes aromáticos. Por estas razones, muchos laboratorios han examinado tales hongos como agentes potenciales de biorremediación (Bumpus y col., 1987) debido a su capacidad de degradar contaminantes tóxicos aromáticos (Asgher y col., 2008).

Tabla 2. Ezimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca envueltos en la degradación de xenobióticos.

Hongo de Pudrición Blanca	Enzimas
<i>Irpex lacteus</i>	Lacc
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP y LiP
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lacc, MnP y VP
<i>Trametes versicolor</i>	Lacc y MnP
<i>Coprinus cinereus</i>	CIP
<i>Poria subvermispora</i>	MnP
<i>Phlebia radiata</i>	LiP
<i>Bjerkandera adusta</i>	LiP y VP

Bumpus y col. (1985) comprobaron que los hongos de pudrición blanca son capaces de degradar no solo lignina, sino también una variedad de contaminantes recalcitrantes incluyendo algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Desde entonces, se ha reportado la degradación de una amplio espectro de contaminantes ambientales por *P. chrysosporium* (Hammel, 1989) cuya mineralización se ha seguido por el marcaje de compuestos con ^{14}C para demostrar la transformación a CO_2 . Reportes posteriores describieron en detalle las rutas de la degradación de contaminantes persistentes como diclorofenol (Valli y Gold 1991), dinitrotolueno (Valli y col., 1992), diclorodibenzodioxina (Valli, Wariishi y Gold, 1992) y antraceno (Hammel, 1991). En cada caso, la

evidencia sugirió que el sistema degradador de lignina de *P. chrysosporium* estaba envuelto en la degradación de estos contaminantes los cuales fueron metabolizados por ciclos de oxidación y subsecuentes reacciones quinona reductoras, rindiendo intermediarios que sufren escisión del anillo aromático.

Phanerochaete chrysosporium, el hongo de pudrición blanca modelo, tiene la habilidad para degradar y mineralizar lignina, el corazón del polímero aromático más abundante, y un rango muy amplio de contaminantes químicos. La biodegradación de la lignina ocurre bajo condiciones limitadas de nutrientes cuando el hongo entra en metabolismo secundario. Solo los hongos de pudrición blanca son conocidos como capaces de degradar completamente lignina (Orth y Tien, 1995).

En la década de los 90s se había dirigido mucha atención a *Phanerochaete chrysosporium* (Bogan y col. 1996) y pocos reportes habían sido publicados sobre otros hongos de pudrición blanca (Vyas y col. 1994; Bezalel y col. 1996), u otros grupos de hongos (Lange y col. 1994; Lambert y col. 1994), aunque existía la posibilidad de que algunas otras especies podrían ser más efectivas en la biodegradación de PAHs.

El reporte de Kim y col. 1995, compara seis hongos de pudrición blanca aislados en Korea, los cuales mostraron una alta actividad de decoloración de tintes (trabajo desarrollado como fase previa a la evaluación de su potencial de utilidad en la biorremediación de PAHs) así como su relativa actividad para degradar pireno un PAH de 4 anillos en un cultivo líquido. *Irpex lacteus*, *Trametes versicolor* KR11W, y *Phanerochaete chrysosporium* mineralizaron 15.6, 12.7 y 7.0% de los 0.84 nmol de pireno radioactivo adicionado, respectivamente. En estos cultivos, el $33 \pm 46\%$ del pireno adicionado fue convertido en metabolitos polares hidrosolubles, y el $22 \pm 40\%$ fue incorporado en biomasa fúngica. *Pleurotus ostreatus* mineraliza solo el 2.5% del pireno adicionado, mientras que *T. versicolor* KR65W y *Microporus vernicipes* fallaron en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de pireno (Hong-Gyu, 1999).

Los hongos ligninolíticos con capacidad de decolorar, tales como *Phanerochaete chrysosporium* (Spadaro y col., 1992), *Pleurotus ostreatus* (Platt y col., 1985), *Coriolus (Trametes) versicolor* (Amaral y col. 2004), *Bjerkandera adusta* (Heinfling y col., 1997) e incluso un *Streptomyces* sp. (Paszczynski y col. 1992), producen oxidasas y peroxidasas extracelulares que contribuyen a la degradación de lignina y de los colorantes sintéticos. Las primeras peroxidasas ligninolíticas, lignina peroxidasa (LiP) (Tien y Kirk 1984) y manganeso peroxidasa (MnP) (Glenn y Gold 1985), fueron aisladas de *P. chrysosporium*. La LiP tiene la capacidad de decolorar tintes azoicos ya sea directa o indirectamente a través de mediadores como alcohol veratrílico (VA), mientras que MnP parece jugar un papel menor en el papel de decoloración, aun en la presencia del ion manganeso (Heinfling et al. 1998a).

Otros hongos de pudrición blanca aparentemente secretan combinaciones únicas de peroxidasas y oxidasas. *Coriolus versicolor* y *Phlebia radiata* producen una o mas lacasas además de LiP and MnP (Niku-Paavola y col.,

1990). *Pleurotus sajor-caju* secreta una arilalcohol oxidasa (Bourbonnais y Paice, 1988), una lacasa, y peroxidasa (Fukuzumi, 1987), *Bjerkandera adusta* secreta una aril alcohol oxidasa (Muheim y col., 1990) y *Rigidoporus lignosus* aparentemente secreta lacasa y una MnP (Galliano y col., 1988).

Pleurotus ostreatus es un basidiomiceto de pudrición blanca que degrada efectivamente la lignina de la pared celular de las plantas (Sarikaya y Ladisch, 1997). Este secreta un serie de isoenzimas pertenecientes a la actividad oxidante de la enzima extracelular manganeso peroxidasa (MnP) (Giardina, 2000) y lacasa (Giardina y col., 1999), los cuales juegan un papel clave en la biodegradación de la lignina (Cohen y col., 2002). En general, las especies del género *Pleurotus* están entre las especies más eficientes en la degradación de lignina, y pertenecen a la subclase de hongos ligninolíticos que producen Lac, MnP, VP, y la enzima aril-alcohol oxidasa (generadora de H₂O₂) pero no LiPs (Muñoz, C y col., 1997). Debido a la producción de peroxidasa, el uso de los hongos ligninolíticos en la biorremediación de suelos contaminados con PAHs fue propuesta por Lestan y Lamar (1996).

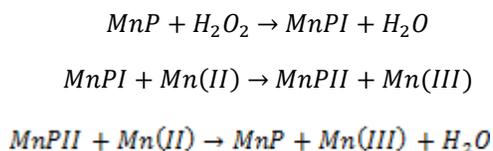
1.5 Enzimas involucradas en la degradación de PAHs por Hongos ligninolíticos

Las peroxidasa son una familia de enzimas desintoxicadoras que catalizan la reducción de H₂O₂ a expensas de varios sustratos reductores. La mayoría de las peroxidasa contienen un grupo hemo y son enzimas que usan el peróxido de hidrogeno para catalizar un número de reacciones oxidativas (Dolphin y col., 1991). En general, las peroxidasa pueden oxidar una amplia variedad de sustratos incluyendo aminas aromáticas, índoles, fenoles, lignina, haluros y manganeso (Dunford, 1991).

1.5.1 Manganeso peroxidasa

La manganeso peroxidasa o peroxidasa manganeso dependiente (MnP) es una enzima descubierta en *Phanerochaete chrysosporium* hace poco mas de 20 años por el grupo de investigadores de Gold y Crawford (Kuwara M., y col., 1984; Paszcynski A., 1985). La MnP existe como series de isoenzimas glicosiladas cuya expresión está regulada diferencialmente (Cohen, 2001), y sus roles fisiológicos parecen ser diferentes (Kamitsuji y 2005). Las isoenzimas de la MnP tienen puntos isoeléctricos (pIs) que van de 4.2 a 4.9 y masas moleculares de 45 a 47 kDa. Cada isoenzima contiene 1 mol de hemo-hierro por mol de proteína. La oxidación de lignina y otros fenoles por MnP es dependiente de ion manganeso (Paszcynski, 1986). El sustrado reductor en el ciclo catalítico de la MnP es Mn (II), el cual reduce eficientemente el compuesto I (MnPI) y el compuesto II (MnPII), generando Mn (III), el cual subsecuentemente oxida el sustrato orgánico. Los ácidos orgánicos tales como el oxalato y malonato, los cuales son secretados por *P. chrysosporium*, estimulan la reacción de MnP por la quelación de Mn (III) para formar complejos estables de alto potencial redox de tal forma que pueda difundirse

desde la superficie de la enzima y oxide el sustrato terminal insoluble, lignina (Wariishi y col., 1989, 1992; Young y col., 2001).



La MnP cataliza la oxidación de lignina dependiente de H₂O₂ (Wariishi y col., 1991), derivados de lignina (Lackner y col., 1991), y una variedad de compuestos fenólicos similares a la lignina (Tuor y col., 1992). Normalmente, la MnP no oxida los compuestos aromáticos no fenólicos como el alcohol veratrílico (VA), el cual es un sustrato típico para la lignina peroxidasa. Se ha demostrado que el Mn(II) es el sustrato preferido para MnP. Por lo tanto el ion Mn participa en la reacción como una pareja redox difusible más que un activador enlazado a la enzima. Esto fue demostrado cuando el Mn (III) preparado químicamente acompañado con un ácido orgánico tal como el malonato imita las reacciones de MnP. La reacción inicial de Mn (III) con un fenol es una oxidación de un electrón para formar un radical fenoxi intermediario. Subsecuentemente, la escisión alquil-fenil, C-C, u oxidación carbinol benzílico produce una variedad de productos (Wariishi y col., 1989).

Las isoenzimas de MnP están codificadas por múltiples genes (Pease y Tien, 1992). El gen *mnp1* de la cepa *P. chrysosporium* OGC101 codifica una proteína Madura de 357 amino ácidos precedida de una secuencia guía de 21 aminoácidos (Pribnow y col., 1989). Las regiones codificantes de *mnp1* y *mnp2* tienen una identidad en nucleótidos de aproximadamente 70% y una identidad de 88% en aminoácidos. Los cDNAs de *mnp* y *lip* exhiben cerca de 50 a 65% de identidad a nivel de aminoácidos y cerca de un 60% de identidad a nivel de nucleótidos. Ambas enzimas tienen una abundancia de residuos ácidos, consistente con sus pIs bajos. La secuencia líder de MnP consiste de dominios amino terminal, hidrofóbico y carbonilo terminal característicos de los péptidos señal (von Heone, 1985).

Las MnPs carecen de la región carbonilo terminal rica en prolina encontrada en LiPs. La enzima MnP1 contiene tres sitios potenciales de N-glicosilación mientras que la secuencia MnP2 contiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación. Ambas isoenzimas tienen un número potencial de sitios O-glicosilación. La región codificante de los genes *mnp* tienen un alto contenido de G+C, pero sus índices de codones son más bajos que los de la mayoría de las secuencias *lip*. El gen *mnp2* contiene menos codones que la secuencia *mnp1* (Ritch y Gold, 1992). El gen *mnp1* contiene seis intrones en el rango de 57 a 72 bp (Godfrey y col., 1990), y el gen *mnp2* contiene siete intrones de 50 to 55 bp. Hay poca similitud en las posiciones de los intrones entre los genes *mnp* y *lip*. Por ejemplo, los genes *mnp* carecen de la secuencia líder del intrón encontrada en los genes *lip*. Los genes *mnp* también carecen del intrón adyacente al carbonilo terminal. La región 5' no traducida de los genes *mnp* contienen

un elemento TATAA en la posición -81 relativa a la traducción del codón de inicio, así como tres elementos invertidos CCAAT (ATTGG). El codón de inicio está incrustado en la secuencia consenso de los eucariotes GCAATGG (Kozak, 1983). La región promotora de los genes *mnp* contienen un probable sitio de reconocimiento para el factor general de transcripción SP-1 (GGGCGG), y el gen *mnp1* también contiene un probable sitio de reconocimiento AP-2 (TGGGGA) (Wingender, 1988). La región promotora de ambos genes *mnp* contienen, entre muchos otros detalles: cuatro posibles elementos de choque térmico (HSEs) similares a la secuencia consenso C--GAA--1TC--G localizada dentro de las 400 bp río arriba del codón de inicio de la traducción (Godfrey y col., 1990).

El gen *mnp2* contiene seis HSEs dentro de las 1,100 bp de la Met de inicio. Los promotores de *mnp* también contienen posibles elementos consenso que responden a elementos de respuesta a metales (MREs) (Culotta y Hamer, 1989). Cuatro de cinco consensos MREs en el promotor de *mnp1* y dos de las tres MREs en el promotor de *mnp2* están arregladas en pares con solapamientos que forman palíndromos de 4-bp (Alic y Gold, 1991). El análisis de grupos hidrofóbicos se usó para demostrar otras características comunes y para sugerir relaciones evolucionarias entre las peroxidasas. Dividiendo las peroxidasas en tres grupos LiP de *Phlebia radiata* y MnP y LiP de *P. chryso sporium*, peroxidasa de rábano y de nabo, y CcP de levadura (Henrissat y col., 1990)

La acumulación de la actividad de MnP en el medio extracelular de cultivos limitados en nitrógeno depende de la presencia de Mn(II), el sustrato para la enzima (Gold y col., 1991). Los análisis Western inmunoblots de las proteínas intracelulares y exocelulares de *P. chryso sporium* demostraron que MnP está presente solo bajo condiciones limitadas de nitrógeno y solo en la presencia de Mn. Esto indica que el Mn es necesario para la síntesis antes que para la activación de la proteína preexistente (Brown y col., 1990). Otros metales no pueden reemplazar el Mn como inductor de la actividad de MnP (Brown y col., 1990) o mRNA de *mnp* (Brown y col., 1991). En contraste a su efecto sobre la transcripción del gen *mnp*, el Mn no tiene un efecto significativo sobre el peso seco del micelio, sobre las velocidades de consumo de carbono y nitrógeno, sobre la cantidad de proteína extracelular (Bonname y Jeffries, 1990), o sobre la síntesis de alcohol veratrílico un metabolito secundario (Brown y col., 1990). Sin embargo, muchas proteínas adicionales son detectables entre los productos de traducción in vitro de los poli(A)RNAs aislados de los cultivos suplementados con Mn (Brown y col., 1991), lo que sugiere que otras proteínas de *P. chryso sporium* pueden ser reguladas por Mn.

Orth y col., (1991) mostraron que la producción de glioxal oxidasa en un auxótrofo desregulado por lisina es completamente dependiente de la presencia de Mn y es indetectable a concentraciones de Mn tan bajas como 6 μ M. La adenilato ciclasa de *P. chryso sporium* aparentemente requiere Mn para una máxima actividad (McDonald y col., 1985). Los análisis de Northern blot demuestran que un choque térmico a 45°C por 1 h resulta en la acumulación de mRNA *mnp1* aun en células que crecen en la ausencia de Mn (Gold y col., 1991). El mRNA de *mnp* puede ser detectado dentro de los 10 min siguientes a la transferencia de los cultivos de 37 a 45°C. Así como con la inducción de la transcripción del gen *mnp* con Mn, el choque térmico es un inductor efectivo solo

bajo el agotamiento de nitrógeno y el efecto es inhibido por actinomicina D. El mRNA de *mnp* inducido por choque térmico no es detectable por mucho tiempo, apenas 1 hora después de que la temperatura ha regresado a 37°C, y los efectos del choque térmico y Mn sobre la transcripción del gen *mnp* parecen ser adicionales (Brown y col., np).

Sin embargo, la inducción de la transcripción del gen *mnp* por choque térmico en la ausencia de Mn no da como resultado actividad de MnP detectable o la detección de proteína MnP intracelular o exocelular por Western blots. En la presencia tanto de Mn como de choque térmico, la proteína MnP si es producida con actividad catalítica (Brown y col., np). No se sabe por qué el choque térmico no da como resultado la producción de la enzima MnP. Es posible que el Mn sea requerido para el procesamiento del transcrito primario, para la estabilización del mRNA *mnp*, o para etapas posttranscripcionales posteriores. Es posible también que los transcritos inducidos por Mn y choque térmico no sean idénticos. Los genes *mnp* no son genes comunes de choque térmico los cuales tienen intrones y carecen de una secuencia líder 5' no transcrita que es característica de tales genes (Lindquist, 1986). De igual forma, un cDNA que codifica para la isoenzima MnP H4 expresada heterológicamente produjo una proteína extracelular reactiva con el anticuerpo MnP de peso molecular correcto. La enzima resulto activa sobre los sustratos usuales de MnP y es dependiente de Mn (II) y H₂O₂ para su actividad, aunque tiene un pH óptimo ligeramente más bajo de la isoenzima fúngica H4 (Pease y col., 1991).

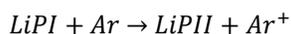
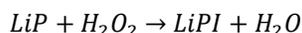
Bogan y col., (1996) analizaron la expresión génica durante la biorremediación de contaminantes orgánicos en suelo por *Phanerochaete chrysosporium*. Janse y col., (1998) analizaron la expresión de los genes que codifican para LiP, MnP y glioxal oxidasa de *P. chrysosporium* en madera. En ambos estudios, los patrones de transcripción observados fueron diferentes de los encontrados en medios definidos. El efecto de Mn²⁺ sobre la expresión génica de peroxidasas fue estudiada durante el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre tallos de algodón. El ion Mn²⁺ afecta la expresión de *mnp3* incluso 2 h después de su adición a los cultivos, sugiriendo un efecto directo del ión metálico sobre la expresión (Cohen y col., 2002), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Brown y col., en la década de los 90s (no publicado) quien propone que el Mn sea requerido para el procesamiento del transcrito primario, para la estabilización del mRNA *mnp* o, para etapas posttranscripcionales.

1.5.2 Lignina Peroxidasa

La lignina peroxidasa (LiP) es una enzima capaz de oxidar compuestos no fenolicos de la lignina. La LiP de *P. chrysosporium* está presente como series de isoenzimas glicosiladas con pls en el rango de 3.2 a 4.0 y masas moleculares en el rango de 38 a 43 kDa. Cada isoenzima contiene 1 mol de hemo-hierro por mol de proteína (Leisola, 1987). Aunque LiP ha sido detectada en muchos hongos de pudrición blanca (Kirk y Farrell, 1987), esta no ha sido detectada en muchos otros hongos que también tienen la capacidad de degradar lignina (Galliano,

1988). En cuanto a los ciclos catalíticos de la LiP y MnP son similares al de la peroxidasa de rábano HRP (Wariishi, 1988).

El producto de la reacción primaria de LiP con H₂O₂ es el estado oxidado de dos electrones del compuesto I, LiPI. Así como con la peroxidasa de rábano, LiPI es reducida de vuelta a la enzima nativa mediante transferencia de dos electrones simples con el compuesto II, LiPII, como intermediario. En este proceso, el sustrato reductor aromático es oxidado a un radical catiónico arilo (Ar⁺).



La diferencia importante entre estas peroxidasas está en la naturaleza del sustrato reductor (Schoemaker, 1990). La LiP cataliza la oxidación de compuestos no fenólicos tales como el alcohol veratrílico a veratrilo aldehído. Por lo tanto la única característica de esta enzima es, que es capaz de oxidar compuestos aromáticos con potenciales redox más allá del alcance de la peroxidasa de rábano y otras peroxidasas. Los resultados cinéticos también indican un mecanismo "Ping-Pong" en el cual H₂O₂ oxida primero la enzima y la enzima oxidada intermediaria (compuesto I) reacciona con alcohol veratrílico (Marquez y col., 1988). La enzima tiene un pH óptimo extremadamente bajo (pH 2.5) para una peroxidasa, y su dependencia de pH aparentemente está controlada por la dependencia de pH de los pasos de reducción en el ciclo catalítico (Márquez y col., 1988).

La LiP cataliza la oxidación dependiente de H₂O₂ de una amplia variedad de compuestos no fenólicos y contaminantes aromáticos (Schoemaker, 1990) incluyendo lignina sintética (Hammel, 1991). Estas reacciones incluyen oxidaciones de alcohol benzílico, escisiones de cadena, reacciones de escisión de anillo, demetoxilaciones y declorinaciones oxidativas, las cuales son consistentes con un mecanismo que comprende la oxidación inicial de un electrón de un núcleo aromático susceptible por un intermediario enzimático oxidado para formar un radical catiónico como sustrato (Renganathan y Gold, 1986). Este último puede producir varias reacciones no enzimáticas para rendir un amplio rango de productos metabólicos. El potencial redox en parte, determina si un núcleo aromático es un sustrato para LiP. Los grupos funcionales fuertes secuestradores de electrones tales como un grupo α-carbonilo tiende a desactivar el núcleo aromático, mientras que los grupos alcoxi como los encontrados en lignina tienden a activarlos (Kirk y Farrell, 1987).

Los genes *lip* que codifican una proteína madura de 343 a 345 aminoácidos son precedidos por una secuencia guía de 27 o 28 residuos. Las proteínas maduras codificadas tienen pesos moleculares de 36360 a 36607 Da, y pesos moleculares aparentes de 38,000 a 43,000 Da (Leisola, 1987). El restante 6 a 13% del peso molecular aparente presumiblemente está contado por la glicosilación. Las secuencias que rodean los residuos, histidina distal y proximal y la arginina distal, no están solo conservadas entre los genes *lip*, sino también en otras

peroxidasas (Tien y Tu, 1987) lo que hace pensar que son esenciales para su actividad. Se ha propuesto que un ácido aspartico que esta enlazado mediante un puente de hidrógeno al residuo His proximal afecta la formación del compuesto I en peroxidasas citocromo c (CcP) (Finzel, 1984). La conservación de estos aminoácidos entre las peroxidasas de hongos y plantas está reflejado en la similaridad de sus ciclos catalíticos.

Las regiones codificantes de los genes *lip* contienen aproximadamente de un 60 a un 65% G+C, mientras que las regiones 3' no codificantes contienen aproximadamente de 44 a 49% G+C. El péptido señal de LiP de 21 aminoácidos consiste de un extremo amino terminal hidrofóbico y un extremo carbonilo terminal típico de las proteínas secretadas. El propeptido de siete aminoácidos tiene un sitio de escisión siguiendo la secuencia -Lys-Arg- (Ritch, 1991).

Todos los genes *lip* secuenciados de *P. chrysosporium* contienen ocho o nueve intrones en el rango de 49 a 78 bp. Seis de los intrones están en posiciones idénticas en todos los genes *lip*, y las secuencias que rodean las uniones intron/exon también están conservadas. Las regiones no codificantes 5' de los genes *lip* secuenciados contienen una caja TATA situada entre 66 a 81 bp río arriba del codón de inicio de la traducción y una secuencia CAAT localizada entre 107 y 228 pb. Secuencias similares o idénticas a aquellas que se unen a la respuesta cAMP que enlaza proteínas (Lin y Green, 1988) y el cAMP que responde a la proteína activadora 2 (Imagawa y col., 1987) se han encontrado en la región promotora de muchos pero no todos los genes secuenciados *lip*.

El gen *lip* de *P. chrysosporium* ha mostrado hibridar a múltiples secuencias en el DNA de otros hongos de pudrición blanca (Kimura y col., 1990). Una clona de cDNA que codifica para un gen de lignina peroxidasa de *Phlebia radiata* ha sido secuenciado y es idéntico en aproximadamente el 60% a los nucleótidos y secuencias de aminoácidos de genes *lip* de *P. chrysosporium* (Saloheimo y col., 1989). Un gen secuenciado de lignina peroxidasa de *Trametes versicolor* tiene de 55 a 60% de aminoácidos idénticos a los de los genes *lip* de *P. chrysosporium*. De la misma forma que en *P. chrysosporium*, las LiPs de *T. versicolor* están codificadas por genes múltiples, de los que algunos están agrupados en el genoma (Black y Reddy, 1991). Las LiPs de *P. chrysosporium* tienen una extensión carbonilo terminal de 40-50 residuos comparada con las otras peroxidasas (Henrissat y col., 1990).

Las secuencias de CcP, MnP, LiP, HRP, y peroxidasas de nabo, tabaco, tomate y papa se analizaron mediante un alineamiento progresivo. El alineamiento de CcP con la secuencia de aminoácidos de LiP2 de *P. chrysosporium* OGC101 indica un 20.8% de identidad. Los resultados con otras secuencias LiP son similares. Este análisis también demuestra que MnP está más cercanamente relacionada a CcP (22 to 23% de identidad) de lo que están las LiPs de *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, y *Phlebia radiata*. Las peroxidasas de plantas están más distantemente relacionadas.

La actividad ligninolítica en los cultivos de *P. chrysosporium* es una función del metabolismo secundario que es disparada por la disminución de nitrógeno en el medio (Keyser y col., 1978). La adición de NH₄ o varios compuestos de nitrógeno a cultivos ligninolíticos suprimen la degradación de lignina así como la producción del metabolito secundario alcohol veratrílico (Fenn y Kirk, 1981). Sin embargo, existe la evidencia de que la regulación basada en la fuente de nitrógeno depende de la cepa (Buswell y col., 1984) y que puede ser afectada por la fuente de carbono disponible (Tonon, 1990). Muchas selecciones han sido ideadas para mutantes que no son reguladas por nitrógeno para la degradación de lignina. Una de tales selecciones utiliza colorantes poliméricos los cuales pueden servir como sustratos para el sistema ligninolítico (Gold, 1988). Este protocolo ha sido usado para aislar cepas mutantes de *P. chrysosporium* que decolora azul brillante de remazol (Kuwahara y Asada, 1987) y poly R (Boominathan y col., 1990) en altas concentraciones de nitrógeno y bajas concentraciones de oxígeno.

Tien y Myer mutaron una lisina auxotrofa y seleccionaron las mutantes que crecían en un medio con nitrógeno suficiente, suplementado con un aducto de lisina y un compuesto del modelo de la lignina (Tien y Myer, 1990). Las mutantes no reguladas por nitrógeno con frecuencia parecen producir más peroxidasa extracelular en comparación con la cepa silvestre (Orth y col., 1991), probablemente a causa del aumento en la masa celular bajo condiciones ricas en nutrientes. Tien y Tu, (1987) usaron traducción in vitro de RNAs poly(A) y un análisis de Northern blot para demostrar que LiP esta regulada por nitrógeno a nivel de mRNA. El análisis Northern blot indica que MnP también es regulada por nitrógeno a nivel transcripcional (Pribnow y col., 1989). Hay evidencias para sugerir que las isoenzimas LiP y MnP pueden ser diferencialmente reguladas por la fuente de carbono y nitrógeno (Holzbaur y Tien, 1988; Tien y Myer, 1990)

El inicio de la actividad ligninolítica en *P. chrysosporium* ha sido relacionada con el aumento en los niveles de cAMP. Estudios con inhibidores de cAMP sugieren que LiP es inhibida y que la producción de MnP también es retardada o incluso inhibida cuando los niveles intracelulares de cAMP disminuyen (Boominathan y Reddy, 1992). Por otra parte, la adición de alcohol veratrílico, un metabolito secundario de *P. chrysosporium* y un sustrato de LiP, o bencil alcohol para cultivos de hongos resultan en un aumento en la actividad de LiP (Leisola, 1985). Aunque el alcohol veratrílico ha mostrado proteger a LiP de la inactivación por H₂O₂, este es menos efectivo de lo que el bencil alcohol lo es protegiendo la enzima en este aspecto (Wariishi y Gold 1990). Por lo que es concebible que estos u otros compuestos aromáticos, incluyendo posibles sustratos de LiP o productos de reacción, puedan inducir la expresión de LiP.

Desde hace dos décadas se ha buscado la sobre producción de Lip debido a que tiene la capacidad de atacar compuestos que la MnP por su potencial redox no puede oxidar, por lo que un cDNA de *lip* carente de secuencia líder se expreso en cepas de *Escherichia coli*. La apoproteína estaba presente en cuerpos de inclusión y carecía de glicosilación (Andrawis y col., 1990). Sin embargo, debido a que no se ha descrito una exitosa reconstitución de la holoenzima, este sistema no es actualmente conveniente para la producción de LiP activa. Posteriormente

el cDNA de *lip* y *mnp* de *P. chrysosporium* se expresaron en el sistema de baculovirus. Una clona de cDNA que codifica para la isozima LiP H8 se uso para expresar la proteína extracelular glicosilada conteniendo Fe protoporfirina IX y capaz de oxidar yoduro y alcohol veratrilico. Sin embargo, la proteína recombinante fue solo 50% activa en contra de alcohol veratrilico comparado con la LiP nativa. Se obtuvieron dos proteínas recombinantes las cuales reaccionaban con los anticuerpos monoclonales anti H8 y que diferían ligeramente en el peso molecular. También se detectaron pequeñas proteínas intracelulares inmunoreactivas (Johnson y Li, 1991).

En la isozima H8 de LiP (PcLiPH8) de *P. chrysosporium* un análisis de una mutación puntual demostró que un triptófano (W171) fue crucial para la oxidación del VA (Sollewijn y col., 2002). Esto sugirió que el VA oxidado formó un radical catiónico complejo con la enzima (Khindaria y col., 1997) y que este radical complejo enzimático oxidó RNasa A (Sheng y Gold, 1999). Este triptófano esta conservado entre LiPs.

1.5.3 Peroxidasas Versatiles

Las peroxidasas versátiles (VP) son hemoenzimas que oxidan tanto Mn^{2+} asi como compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos en ausencia de mediadores. Estas enzimas se reportaron inicialmente en *Pleurotus eryngii* (Martínez, M. J. y col., 1996) aunque posteriormente se encontraron en varias especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Heinfling, A. y col., 1998).

A diferencia de la MnP de *P. Chrysosporium*, las peroxidasas que oxidan Mn^{2+} a Mn^{3+} aisladas de *B. adusta* y *P. eryngii* tienen la capacidad de oxidar múltiples colorantes azo, aun en ausencia del ión manganeso (Camarero y col., 1999). Las VPs también oxidan compuestos aromáticos tales como VA (un sustrato típico de LiP) a veratril aldehído, el dímero modelo de lignina veratrilglicerol-*b*-guaiacol éter (usado para demostrar la habilidad ligninolítica de LiP) y *p*-dimetoxibenzeno rindiendo veratrilaldehído y *p*- benzoquinona, respectivamente (como esta reportado para LiP) (Caramelo y col., 1999). El pH óptimo para la oxidación de Mn^{2+} (pH 5) y compuestos aromáticos y colorantes (pH 3) difiere entre sí, siendo similar al pH óptimo para la actividad de MnP y LiP, respectivamente. Estas enzimas fueron por lo tanto denominadas peroxidasas híbridas MnP-LiP, peroxidasas manganeso independientes o peroxidasas versátiles (VPs) debido a que tienen propiedades tanto de LiP como de MnP (Martínez, A. T. 2002).

Las VPs han mostrado un papel importante en el rol de la decoloración de los colorantes azo (Heinfling et al. 1998a, b) por hongos de pudrición blanca tales como *P.eryngii* (Gómez-Toribio et al. 2001), *Pleurotus pulmonarius* (Camarero et al. 1996), *P. ostreatus* (Cohen et al. 2002), *B.adusta* (Heinfling et al. 1997, 1998a-c), y *Bjerkandera sp.* (Moreira y col. 2005). En contraste, no se ha identificado ninguna VP de *P. chrysosporium*.

Las VPs oxidan además hidroquinonas y fenoles sustituidos que son sustratos para las peroxidases de plantas (Heinfling, A. y col., 1998).

En *P. eryngii* se aislaron dos peroxidases por su capacidad para degradar lignina selectivamente. Una de ellas denominada como VP-PS1 la cual muestra actividad sobre Mn^{2+} , 2,6-dimethoxyphenol y methoxy-*p*-hidroquinona similar a la actividad presentada por MnPL1 una isoenzima aislada de cultivo líquido (isoenzima PL). Sin embargo, la isoenzima VP-PS1 expresada en cultivo sólido presenta menor actividad que MnPL1 sobre VA, *p*-methoxybenzeno, y dímeros modelo de lignina, lo cual sugiere su bajo potencial redox (Camarero y col., 1999; Ruiz-Dueñas y col., 2001). Se obtuvieron pruebas de DNA PCR y RT-PCR, usando cebadores correspondientes a las secuencias del extremo N-terminal e internas de los péptidos de VP-PL obtenidos por digestión con tripsina, y usados para seleccionar las clonas de cDNA y DNA genómico que contienen el gen correspondiente. El gen *pl* aparece como dos alelos, compartiendo 99% de la secuencia, la cual codifica las dos peroxidases aisladas del cultivo líquido (Ruiz-Dueñas y col., 1999a). Las variantes VP alélicas PL1 y PL2 difieren solo en tres residuos aminoácidos pero pueden ser identificados porque una de las sustituciones está en la region N-terminal. Un segundo gen fue clonado codificando VP-PS1 producida en cultivos lignocelulósicos (Camarero y col., 1999). Ambos genes de *Pl. eryngii* (*pl* y *ps1*) contienen 15 intrones y codifican proteínas con 361 amino ácidos (incluyendo un péptido señal de 30 amino ácidos) en el caso de VP-PL, y 370 amino ácidos (incluyendo un péptido señal de 31 amino ácidos) en el caso de VP-PS1, mostrando una identidad en la secuencia de 74%. La presencia de los posibles elementos para la respuesta al estrés oxidativo en los promotores de estos genes pueden explicar la regulación transcripcional de VP de *Pl. eryngii* por H_2O_2 y otras especies oxígeno reducidas (Ruiz-Dueñas y col., 1999b). Su expresión heteróloga rindió peroxidases recombinantes con las mismas propiedades catalíticas de VP silvestre (Ruiz-Dueñas y col., 1999c).

Las secuencias de las dos peroxidases maduras de *Pl. eryngii* estan cercanas a las peroxidases de *P. ostreatus* recientemente depositadas como MnP2 (Giardina y col., 2000), mostrando 98% de identidad con VP-PS1, y MnP3 (Irie y col., 2000), compartiendo un 77% de identidad con VP-PL. La secuencia del primer gen MnP reportado en *P. ostreatus* (Asada y col., 1995) esta menos relacionada. Es interesante que las isoenzimas de VP de *Pl. eryngii* tengan una alta secuencia de identidad con LiP de *Ph. chrysosporium* (de hasta 60% para VP-PL y 62% para VP-PS1) que las isoenzimas de MnP (hasta de 55% para VP-PL y 57% para VP-PS1). Las propiedades catalíticas de las peroxidases versátiles de *Pleurotus* y *Bjerkandera sp.* son similares entre si (Martínez, 2002).

Los genes que codifican las isoenzimas de VP, VPL y VPS1 de *Pleurotus eryngii*, expresadas en cultivos en estado líquido y sólido, respectivamente, han sido clonadas (Camarero y col., 2000; Pérez-Boada, 2002). El cDNA que codifica la secuencia madura de la variante alélica VPL2 de *P. eryngii* (GenBankTM número de acceso AF007222) (Ruiz-Dueñas y col., 1999a) fue clonada en el vector de expresión pFLAG1 y usada para transformar *E. coli* W3110. Las células transformadas fueron inducidas con isopropil.-D-tiogalactopiranosido 1mM

(Pogni y col., 2008). Las secuencias de amino ácidos deducidas para ambas enzimas (VPL y VPS1) fueron usadas para construir modelos moleculares por modelado de homología, tomando ventaja de la identidad de secuencia a LiP y MnP de *P. Chrysosporium* y la peroxidasa de *Coprinopsis cinérea* (Ruíz-Dueñas y col., 2001). Muy recientemente, la estructura cristalina de la VP recombinante de *P.eryngii* expresada en *Escherichia coli* y activada in vitro (Pérez-Boada y col., 2000) ha sido determinada a una resolución de 1.33 Å (Protein Data Bank code 2BOQ).

Un análisis cinético y uno basado en un modelado tridimensional por computadora ha sugerido que las VPs tienen dos sitios activos independientes (Camarero et al. 1999) (Fig. 3). Estudios más recientes han indicado que la oxidación directa requiere un residuo crítico triptófano aparte del sitio de enlace a Mn^{2+} (Kamitsuji et al. 2005).

El triptófano (W171) esta conservado entre LiPs y también las isoenzimas VP (Martínez, 2002). Un análisis de mutación puntual de *P. eryngii* VPL (PeVPL) demostraron que el triptófano (W164) es esencial para la oxidación de sustratos de bajo peso molecular tales como el VA y el Reactivo Negro 5 ($M_r = 991$), aunque las enzimas mutantes fueron producidas por un sistema de expresión en *Escherichia coli* (Pérez-Boada y col., 2005) en el cual las enzimas activas fueron preparadas como una fracción de un polipéptido replegado *in vitro* en la presencia de hemo (Pérez-Boada, 2002). La MnP2 de *P. ostreatus* también tiene el triptófano correspondiente (W170), el cual puede sugerir que MnP2 oxida VA en este residuo. Sin embargo, se desconoce cómo es que la MnP2 oxida directamente los sustratos de alto peso molecular en la ausencia de mediadores redox.

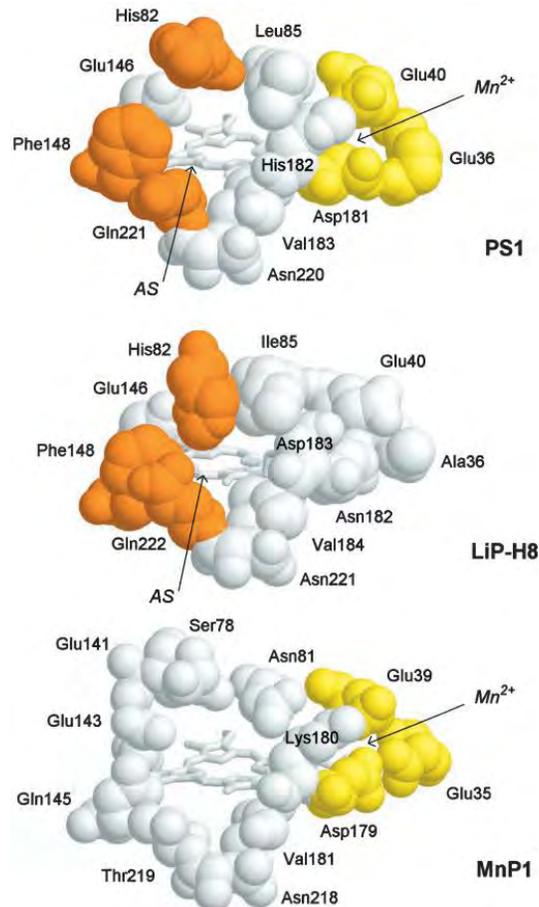


Fig 3. Estructura de sitios catalíticos de una peroxidasa versátil (PS1), lignina peroxidasa (LiP-H8) y manganeso peroxidasa MnP1.

En años recientes, diferentes peroxidasas han sido purificadas de las especies *Pleurotus*, y sus genes han sido secuenciados y analizados. Esto incluye al gen *mnp1* (Asada y col., 1995), *mnp2* (Giardina y col., 200), *mnp3* (Irie y col., 2000) de *P. ostreatus* así como el gen *vpl* (correspondiente al gen *mnp4* *P. ostreatus*) y *vps1* de *Pleurotus eryngii*, el cual muestra alta identidad con el gen *mnp2* de *P. ostreatus* (Ruiz-Dueñas y col., 2001). La MnP2 de *P. ostreatus* (~43 kDa) tiene una amplia especificidad de sustrato, ya que oxida VA (Kamitsuji, 2005). De más interés resulta que MnP2 de *P. ostreatus* oxida directamente aun compuestos de alto peso molecular como RNasa A (~13.7 kDa) y un colorante polimérico azo, Poly R-478 (40-100 kDa) (Kamitsuji, 2005), una propiedad que no ha sido reportada en otras peroxidasas fungicas. Peroxidadas con una especificidad de sustrato similar han sido reportadas también en *Pleurotus eryngii* (Martínez, 1996), *Bjerkandera adusta* (Palma y col., 2000), y *Lepista irina* (Zorn, 2003). En contraste, LiP de *P. chrysosporium* oxida el Poly R-478 (Harvey, 1995), RNasa A (Sheng y Gold, 1999), y ferrocitocromo c (Sheng y Gold, 1998) solo cuando el VA está presente en la mezcla de reacción.

2. Expresión Heteróloga de peroxidasas

La expresión heteróloga de enzimas significa que una proteína es producida en una célula hospedera que normalmente no la producía. La selección de la célula hospedera está basada en ciertos aspectos como la factibilidad de que el hospedero acepte la transferencia de material genético o necesidades como la obtención de grandes cantidades de enzima. En el último aspecto, los hongos filamentosos, especialmente los miembros del género *Aspergillus*, tienen la habilidad de secretar un amplio rango de enzimas en grandes cantidades en el ambiente. Esta característica ha favorecido el uso de estos organismos para una producción a gran escala de enzimas importantes en el área de la biotecnología (Broekhuijsen y col., 1993; Verdoes y col., 1995), como lo son las peroxidasas las cuales además de aplicarse en procesos industriales también tienen gran importancia en el área de la biorremediación de suelos contaminados con compuestos recalcitrantes. La sobre producción de este tipo de enzimas también es necesario para llevar a cabo un análisis detallado de la función de la enzima en relación con su estructura.

Aunque la producción de proteínas a partir de hongos es usualmente muy eficiente, las proteínas no fungicas son pobremente producidas y alcanzan niveles que con frecuencia no exceden unos pocos miligramos por litro (Van den Hondel y col., 1991; Van Gorcom y col., 1994). Por lo tanto, muchas estrategias han sido desarrolladas para mejorar estos rendimientos. Una estrategia exitosa está basada en el uso del sistema de transporte de una proteína bien secretada, usualmente glucoamilasa (GLA) de *Aspergillus niger* (Ward y col., 1990; Ward y col., 1995) o celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (Nyyssönen, E., and S. Keränen, 1995). Este sistema de transporte también conocido como péptido señal, es fusionado al extremo amino terminal de una proteína heteróloga con lo que se mejora la eficiencia de secreción al facilitar la translocación y el consecuente plegamiento en el retículo endoplasmico. Además a lo largo de la ruta en la mayoría de los casos la proteína de fusión es escindida, resultando en la secreción de la proteína de interés por separado. El rompimiento ocurre ya sea por un proceso auto catalítico de la proteína heteróloga (Ward y col., 1990), por una proteasa fúngica (Nyyssönen y col., 1993) o por una proteasa semejante a KEX2, para lo cual un sitio de reconocimiento ha sido introducido en la proteína de fusión (Ward y col., 1995).

Otra estrategia se refiere al uso de secuencias de regulación de la transcripción llamadas promotores los cuales pueden ser inducibles o constitutivos. Los sistemas de expresión inducible permiten la separación de la producción de proteínas de la formación de biomasa, mejorando con ello el rendimiento y calidad de la proteína, mientras que los promotores constitutivos no dependen de inductores y se utilizan para la expresión de enzimas comercialmente importantes. Dentro de este grupo de promotores están las secuencias que regulan la transcripción de enzimas activas en funciones perpetuas del ciclo de vida de los microorganismos como es la respiración.

3. Fermentación en Estado Sólido

Los procesos de cultivo en sistemas sólidos pueden ser definidos como “el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) sobre materiales sólidos húmedos en ausencia de agua libre fluyendo” (Cannel y Moo Young, 1980). El proceso está constituido por una matriz sólida porosa la cual puede ser o no ser biodegradable, con una gran superficie por unidad de volumen en la cual puede haber crecimiento microbiano en la interfase sólido/gas. Dentro de los soportes biodegradables o sustratos fermentables tradicionales para cultivo sólido se incluyen una amplia variedad de productos agrícolas como arroz, trigo, cebada, granos, frijoles, maíz y soya. Sin embargo, dependiendo de la aplicación, lo más rentable sería utilizar sustratos no tradicionales los cuales pueden ser de interés industrial, incluyendo una gran cantidad de desechos agrícolas, forestales y alimenticios.

La utilización de un soporte sólido es afectado por varios factores físicos y químicos, como el tamaño de partícula, la porosidad y la composición química, el costo y la disponibilidad son otros factores importantes que hay que tomar en cuenta. Como consecuencia, la selección de un adecuado material sólido juega un papel importante en el desarrollo de un eficiente sistema de cultivo sólido (Couto y col., 2002). Las características de los materiales en los que se desarrollan los microorganismos han sido reportadas como uno de los aspectos fundamentales para la efectividad de los sistemas de biorremediación (Ortiz y col., 2003b). Entre otras características, deben proporcionar un área grande para la formación de la biopelícula y deben permitir una correcta aireación.

Las bacterias, levaduras y hongos pueden crecer en soportes sólidos, sin embargo, los hongos filamentosos debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas, son los mejor adaptados para estas condiciones y abarcan la mayoría de la investigación en cultivo sólido. El crecimiento de los hongos a través de la formación de hifas así como su tolerancia condiciones de baja actividad de agua (A_w) y altas presiones osmóticas hacen a los hongos eficientes y competitivos en los cultivos sólidos (Raimbault, 1998). El crecimiento a través de hifas permite que los hongos filamentosos penetren en los soportes. Una estructura celular presente en la punta de la hifa así como las ramificaciones del micelio permiten fijarse firmemente a una superficie sólida. Los hongos no pueden transportar a los sustratos, pero el crecimiento de las hifas permite el contacto entre el sustrato y las hifas. El micelio sintetiza y excreta al medio grandes cantidades de enzimas, las cuales generan productos simples que si pueden entrar al micelio a través de la membrana y promover la actividad metabólica del hongo.

Sin embargo, la degradación microbiana de los PAHs en el suelo ha estado restringida por varios factores que con frecuencia resultan en una eficiencia de biorremediación menor a la esperada. Uno de estos factores es la baja biodisponibilidad de los compuestos. Otro factor importante en la biorremediación de suelos contaminados es la disponibilidad de nitrógeno y fósforo, el cual permite el incremento necesario en el tamaño de las poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos. También se debe tomar en cuenta el hecho de que cada sitio contaminado puede responder de diferente forma, por lo cual se han desarrollado protocolos de

biorremediación a escala laboratorio con el objetivo de determinar las condiciones que afectan la degradación de PAHs por microorganismos (Sabate y col., 2004). En tales estudios de factibilidad se ha probado un inóculo exógeno, la adición de nutrientes, biosurfactantes y otros aditivos. En la mayoría de estos estudios el sondeo del proceso está basado en el análisis químico de los contaminantes. Los factores abióticos pueden afectar la tasa de degradación de PAHs. La adsorción y la desorción pueden afectar la disponibilidad para los microorganismos y por lo tanto su transformación. La hidrofobicidad de los PAHs favorecen su adsorción en la materia orgánica (Lau y col., 2003) por atracciones eléctricas, fuerzas de van der Waal, enlaces covalentes y/ o enlaces de hidrogeno. Además numerosos estudios atribuyen la remoción de los PAHs a la absorción, volatilización, y la incorporación de estos a la biomasa microbiana (Van Gestel y col., 2003).

4. Screening de lacasas (Lac), peroxidasas (MnP y LiP) y peroxidasas versátiles (VPs).

El interés sobre el estudio de enzimas ligninolíticas en hongos de pudrición blanca se ha traspasado también a los hongos filamentosos no ligninolíticos no solo con el objetivo de la comparación biológica, sino con la esperanza de encontrar mejores sistemas de degradación de compuestos aromáticos para su uso en varias aplicaciones biotecnológicas como la biotransformación de fibras de plantas para la alimentación, la producción de enzimas, antibióticos, polisacáridos, otros compuestos fisiológicamente activos y combustibles, el bio-blanqueamiento de la pulpa de papel, el tratamiento de aguas residuales y principalmente la biorremediación de suelos contaminados (Cerniglia, 1997).

Actualmente, la prerrogativa de que solo los hongos de pudrición blanca producen enzimas capaces de degradar compuestos aromáticos esta desechada. Naranjo y col., 2007 aislaron cepas fúngicas no ligninolíticas capaces de usar petróleo crudo extra pesado del cinturón de petróleo Orinoco de Venezuela y muchos PAHs como única fuente de carbón y energía. En dichos aislados fueron identificados los generos *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Pseudallescheria*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* y *Paecilomyces*. Los ensayos fenotípicos y bioquímicos revelaron la capacidad de estos hongos filamentosos para sintetizar enzimas extracelulares oxidativas, y sugirieron una relación entre los sistemas de degradación ligninolítica y la bioconversión de petróleo crudo extra pesado. Este trabajo reporta por primera vez el uso de dihidrocloruro de o-fenilenediamina (OPD) como sustrato para medir peroxidasa ligninolítica extracelular en caldos de cultivo de hongos filamentosos (*Fusarium solani* HP-1), y constituye el primer estudio formal de la comunidad fúngica asociada a la zona de aislamiento.

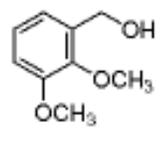
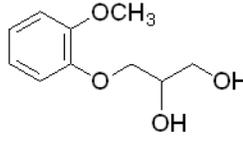
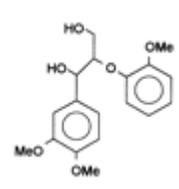
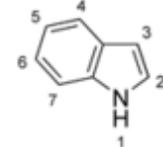
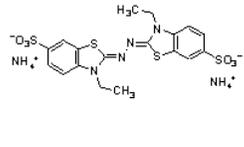
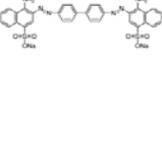
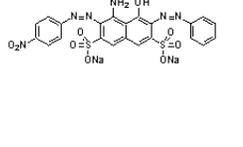
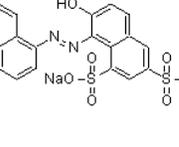
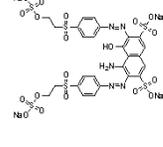
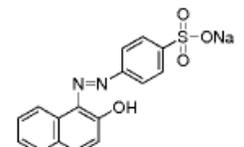
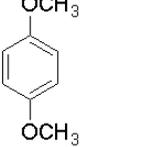
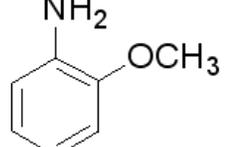
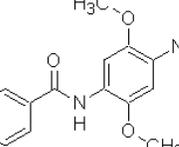
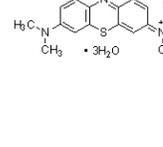
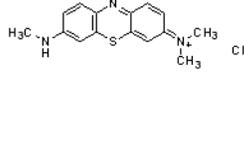
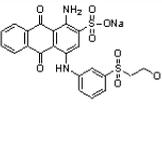
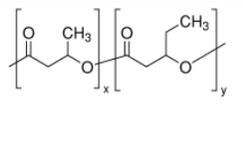
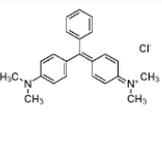
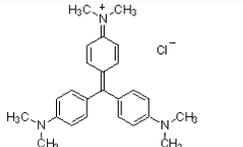
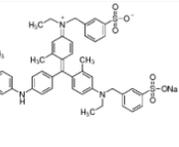
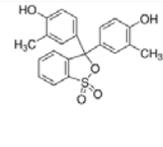
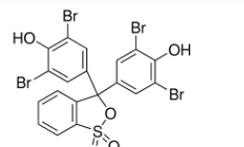
Dhouib y col., (2005) reportan un ascomiceto, *Trichoderma atroviridae*, como productor de lacasa y géneros de basidiomicetos como superproductores de peroxidasas que no habían sido reportados antes. Otros ascomicetos

como *Paecilomyces variotti* (Estevez y col., 2005) y *Scedosporium apiospermum* se han utilizado en sistemas de biofiltración para la remoción de tolueno (García Peña, 2001) aunque no se tiene un acercamiento al tipo de actividad enzimática que poseen.

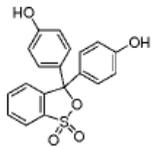
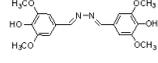
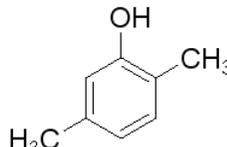
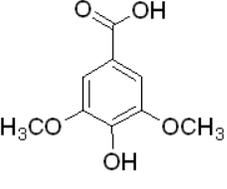
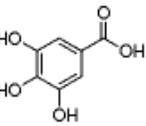
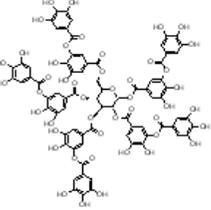
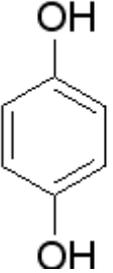
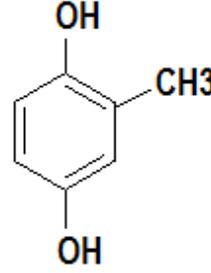
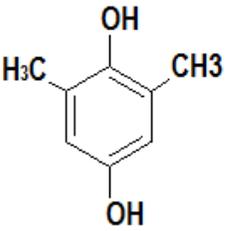
Aunque la identificación de enzimas ligninolíticas por técnicas de biología molecular es factible en algunos casos, es consumidora de tiempo en la mayoría de ellos por lo que se hace necesaria la implementación de pruebas rápidas y confiables. El propósito del screening de enzimas es elucidar el tipo, la diversidad o el grado de actividad enzimática análoga a las peroxidasas ya conocidas (Lac, MnP y VP). En este aspecto los colorantes pueden ser de mucha ayuda pues además de que presentan estructuras complejas análogas a las de los PAHs (Tabla. 3) pueden dar una respuesta rápida y visible cuando cambian de color por efecto de la oxidación de su estructura. El uso de colorantes para la identificación de enzimas de tipo ligninolítico ya ha sido reportado (Stajic y col., 2004). Aunque las peroxidasas tienen una baja especificidad cada una presenta afinidad por ciertos sustratos debido al potencial redox además como toda molécula bioactiva reconocen cierta estructura de ataque al sustrato lo cual puede producir diferentes coloraciones en un mismo compuesto por la acción de una u otra enzima en determinado tiempo.

La LiP tiene la capacidad de degradar los colorantes azoicos con el alcohol veratrílico como mediador (Tien y Kirk, 1988), otro sustrato específico para LiP es el dímero modelo veratriltglicerol- β -guaiacol eter el cual rinde veratrildehído, también oxida VA a veratrildehído y *p*-dimetoxibenceno a *p*-benzoquinona. En general los sustratos preferidos por LiP son los compuestos de alto potencial redox, no fenólicos y bencenos metoxilados mientras que MnP tiene la capacidad de oxidar compuestos fenólicos como el Rojo fenol, el Poly R-478 el cual es un colorante de tipo antraquinona, Orange 16 y DMP. Por otra parte las oxidasas como Lac oxidan ABTS, pero no Rojo ácido ni cristal violeta y tardan mucho en decolorar azul de bromofenol. Las VPs oxidan Mn(II) a Mn(III), degradan dímeros no fenólicos, oxida alcohol veratrílico, *p*-dimetoxibenceno y colorantes con alto potencial redox (Camarero 1999). Además, oxida directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos que no son eficientemente oxidados por LiP y MnP en la ausencia de mediadores o de Mn(II), respectivamente (Martínez, 2002). Las VPs poseen diferentes grados de oxidación de colorantes azo (rojo congo, Fast Blue R R (FBRR), rojo ácido 44, Amido Black 10 B y Orange G), colorantes trifenilmetano (verde de malaquita, cristal violeta, rojo cresol, azul brillante de Coomassie G250 (CBB) y azul de bromofenol) y colorantes antraquinóicos (azul R brillante de remazol (RBBR)) grado analítico todos ellos sin VA ni MnII como mediadores. Aunque estas enzimas son las principales, no son las únicas pues se ha comprobado que para su funcionamiento es necesario el producto de una enzima "accesorio" tal como la glioxal oxidasa formadora de H₂O₂, aril alcohol oxidasa, oxalato descarboxilasa (ODC) productora de oxalato, formato deshidrogenasa dependiente de NAD y por supuesto la monooxigenasa P450 también esta presente en hongos de pudrición blanca (Doddapaneni y col., 2005, Aguiar y col., 2006).

Tabla 3. Dímeros y Colorantes Fenólicos y no Fenólicos

Dímeros Fenólicos					
	Alcohol veratrilico	Guaiacol gliceril eter	Veratril glicerol β -guaiacol eter	Indol	ABTS
Colorantes No fenólicos					
Azoicos					
	Rojo congo	Amido Black 10B	Rojo ácido 44,	Reactive Black 5	Orange II
Bencenos metoxilados					
	p-dimetoxibenceno	O-anizidina	Fast Blue RR (FBRR)	Azul de metileno	Azure B
Antraquino-nicos					
	Azul brillante de remazol R	Poly R-478			
Trifenil metano					
	Verde de malaquita	crystal violeta	azul brillante de comassie CG250	Rojo cresol	azul de bromofenol

Continuacion Tabla 3

Colorantes Fenólicos					
					
Rojo fenol	Siringaldazina	DMP (siringol), (2,5-dimetoxifenol)	Acido siringico	Ac. gálico	Ac. tánico
Hidroquinonas					
	1,4-Benzohidroquinona	2-metoxi-1,4-benzohidroquinona	2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona		

Mirjana Stajic y col., (2004) probaron la actividad de lacasa usando siringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azina) 1 mM como sustrato (disuelta en etanol al 96%) y ácido acético 0.1 M (pH 5) a un volumen final de 1 mL. La actividad de MnP fue medida indirectamente por la oxidación dependiente de Mn^{+2} de 2,6-dimetilfenol (DMP) 20mM a coerulignona (3,3',5,5'-tetrametoxi-p,p'-difenoquinona) conteniendo amortiguador de malonato de sodio 250 mM (pH 4.5), $MnSO_4 \cdot H_2O$ 20 mM, H_2O_2 4 mM a 1mL final. VP y lac fueron detectadas mediante DMP 20 mM (sin Mn^{2+} y sin H_2O_2 , respectivamente) en amortiguador de malonato de sodio 250 mM (pH 3 y 5, respectivamente). La actividad de LiP se ha medido en solución por la oxidación de alcohol veratrilico 2 mM a veratrilaldehído en tampón de tartrato 0.1 M, pH 3, con H_2O_2 0.4 mM incluyendo como control la reacción sin H_2O_2 . La MnP se estimó por la formación de tartrato de Mn^{3+} de $MnSO_4$ 0.1 mM en tartrato de sodio 0.1 M, pH 5, con H_2O_2 0.1 mM. La actividad de peroxidasa sobre fenoles fue cuantificada usando siringol 2.5 mM (2,6-dimetoxifenol) también llamado DMP, en tartrato de sodio 0.1 M, pH 3, con H_2O_2 0.1 mM. La actividad de aril alcohol oxidasa (AAO) fue determinada por la formación de veratrilaldehído formado de alcohol veratrilico 5 mM en tampón de fosfato 0.1 M, pH 6. La actividad de lacasa se midió con siringol 10 mM en tartrato de sodio 0.1 M, pH 5 (Camarero y col., 1999).

La actividad de una VP llamada RBP de *Bjerkandera sp.* se evaluo mediante la capacidad para oxidar alcohol veratrilico y DMP en una reacción independiente de manganeso. La oxidación de DMP 1 mM fue estimada por la medición de la absorbancia a 469 nm (30 °C) en tampón de malonato de sodio 50 mM (pH 3.0 y 5.0), en la

presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM. La oxidación de alcohol veratrílico 4.0 mM fue determinado por la medición de la absorbancia a 310 nm (30°C), en tampón de tartrato de sodio 100 mM (pH 3.0 5.0). La decoloración de RBBR también la midieron espectrofotométricamente por el descenso de la absorbancia a 595 nm (30°C) en una mezcla de reacción que contenía RBBR 0.05mM y tampón de tartrato de sodio 70mM (pH 5.0). La actividad sobre manganeso (II) fue determinada espectrofotométricamente por la medición del descenso en la absorbancia a 238 nm (30°C) en una mezcla de reacción que contenía MnSO₄ 0.1 mM y tampón de tartrato de sodio 100 mM (pH 5). La oxidación de 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal diamonio (ABTS) se determino espectrofotométricamente por el descenso en la absorbancia a 420 nm (25°C). La mezcla de reacción consistía de ABTS 0.5 mM y tartrato de sodio 100 mM (pH 5.0) (Moreira y col., 2005).

Los protocolos de cuantificación enzimática presentados anteriormente son monitoreados por espectrofotometría utilizando ya sea el extracto crudo o la enzima purificada obtenida de una fermentación sumergida para lo cual fue necesario entonces estandarizar las condiciones de crecimiento en cultivo sumergido de cada una de las cepas a analizar. Esto se complica cuando se quiere conocer la actividad enzimática de grandes colecciones de cepas fúngicas. Por lo que el desarrollo de una técnica rápida y eficiente de screening de enzimas en cultivo superficial mediante el uso de colorantes podría facilitar la discriminación entre cepas productoras de enzimas oxidativas y cepas que no tienen esa capacidad.

5. Identificación de Hongos

La identificación de hongos se hacía por técnicas esencialmente de microbiología como es el cultivo masivo en placa o el microcultivo para observar características morfológicas. Sin embargo hoy las técnicas de microcultivo son complementarias a las técnicas de identificación molecular. Entre las técnicas de biología molecular, las basadas en PCR, son las más utilizadas actualmente para la identificación de hongos. El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPL) se ha utilizado en la identificación fúngica amplificando un segmento del ADNr con un determinado cebador y posteriormente digerir los amplificados con enzimas de restricción. Los fragmentos digeridos son posteriormente separados mediante electroforesis. Los patrones de bandas obtenidos pueden ser posteriormente analizados por comparación o mediante construcción de árboles filogenéticos. Esta técnica permite, sin secuenciar, detectar una diferencia en una única base localizada en la misma posición entre dos secuencias pertenecientes a dos cepas distintas. Esta diferencia o cambio recibe el nombre de polimorfismo de un único nucleótido (Single-Nucleotide Polymorphism: SNP). Un SNP que elimina un lugar de restricción se le denomina polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

El polimorfismo de ADN amplificado aleatoriamente (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) utiliza la amplificación aleatoria y es particularmente útil para determinar relaciones taxonómicas infraespecíficas y para estudios epidemiológicos. No obstante, uno de los problemas que representa es su baja reproducibilidad. En esta técnica se suelen utilizar cebadores de unos 8-10 nucleótidos que se unirán, debido a su pequeño tamaño, a

múltiples regiones del ADN y generarán numerosas bandas que pueden ser distintas según la secuencia génica que presenten las cepas de estudio.

El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism: AFLP) se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN obtenidos mediante digestión con enzimas de restricción. La amplificación AFLP es específica y reproducible al usar cebadores complementarios a la secuencia de los adaptadores que se ligan a los extremos de los fragmentos de ADN digeridos. La presencia o ausencia de cada banda obtenida genera un patrón de bandas que es específico para cada cepa analizada. Actualmente estos patrones pueden obtenerse mediante sistemas analizadores automatizados.

Los genes utilizados en la identificación de hongos pueden ser de una copia por ejemplo: los genes que codifican actina, calmodulina, quitina sintetasa suelen ser altamente específicos entre especies, pero pueden no llegar a ser lo suficiente sensibles para detectar una baja concentración en el hongo. Por el contrario los genes multicopia presentan una sensibilidad más elevada, debido a que el gen o genes diana van a estar en mayor cantidad en la muestra. Los más utilizados de esta última categoría son el grupo de genes del ADN ribosomal (ADNr). Los ribosomas son los orgánulos responsables de la síntesis de proteínas. Debido a su función esencial para la vida, las regiones que los codifican en los genes de los diferentes organismos se han ido conservando a lo largo de la evolución en una frecuencia muy superior a otros genes. No obstante algunos de sus componentes han ido cambiando durante el proceso de evolución. Tanto las similitudes como los cambios reflejados en los genes del ADNr pueden ser utilizados en la clasificación de hongos.

El ADNr es una formación en tándem de numerosas copias en el genoma haploide de todos los hongos. Comprende, entre otras, las regiones codificantes del gen de la subunidad pequeña (SSU) ADNr (18s), el gen 5.8S y el gen de la subunidad grande (LSU) ADNr (28s), y otras regiones interesantes para la identificación de especies fúngicas como son los ITS (ITS1 y ITS2), y los IGS. Las distintas regiones de este complejo han evolucionado a diferente velocidad, por lo que sus secuencias pueden ser utilizadas para discriminar entre taxones de distinto rango (género y especie). Las regiones IGS e ITS son las que presentan mayor variabilidad en la secuencia, mientras que las regiones que codifican 18S, 5.8S y 28S están mucho más conservadas (Mitchell, JI y col., 1995).

Las ventajas de comparación de las secuencias ITS en la identificación de hongos es que la región a amplificar, con cebadores específicos, es de 600-800 pb., un tamaño apropiado para la amplificación por PCR y cómodo para la posterior purificación del ADN. Lo cual representa una gran ventaja así como la naturaleza multicopia de los genes para los ARN ribosomales que facilitan la amplificación a partir de una muestra de ADN escasa, diluida o parcialmente degradada.

6. ANTECEDENTES

Desde hace veinte años se ha reportado la degradación de un amplio espectro de contaminantes ambientales por *P. chrysosporium* (Hammel, 1989) cuya mineralización se ha seguido por el marcaje de compuestos con ^{14}C para demostrar la transformación a CO_2 . Reportes posteriores describieron en detalle las rutas de la degradación de contaminantes persistentes como diclorofenol (Valli y Gold 1991), dinitrotolueno (Valli y col., 1992), dichlorodibenzodioxina (Valli, Wariishi y Gold, 1992) y antraceno (Hammel, 1991). En cada caso, la evidencia sugirió que el sistema degradador de lignina de *P. chrysosporium* estaba envuelto en la degradación de estos contaminantes los cuales fueron metabolizados por ciclos de oxidación y subsecuentes reacciones quinona reductoras, rindiendo intermediarios que sufren escisión del anillo aromático.

Phanerochaete chrysosporium, el hongo de pudrición blanca modelo, tiene la extraordinaria habilidad para degradar y mineralizar (degradar hasta CO_2) lignina, el corazón del polímero aromático más abundante, y un rango muy amplio de contaminantes químicos por lo que en un inicio se buscó la sobre producción de LiP, mediante la expresión de un cDNA de *lip* carente de secuencia líder en cepas de *Escherichia coli*. Sin embargo, la apoproteína estaba presente en cuerpos de inclusión y carecía de glicosilación (Andrawis y col., 1990). Posteriormente el cDNA de *lip* y *mnp* de *P. chrysosporium* se expresaron en el sistema de baculovirus. Una clona de cDNA que codifica para la isoenzima LiP H8 se usó para expresar la proteína extracelular glicosilada conteniendo Fe protoporfirina IX y capaz de oxidar yoduro y alcohol veratrilico. Sin embargo, la proteína recombinante fue solo 50% activa en contra de alcohol veratrilico comparado con la LiP nativa. Se obtuvieron dos proteínas recombinantes las cuales reaccionaban con los anticuerpos monoclonales anti H8 y que diferían ligeramente en el peso molecular. También se detectaron pequeñas proteínas intracelulares inmunoreactivas (Johnson y Li, 1991). De las peroxidasas que produce *P. Chrysosporium*; la MnP es la que se produce con altos rendimientos en cultivo sólido (Cruz y col., 1999), y bajo esta premisa el gen *mnp1* que codifica para la isoenzima MnP H4 ha sido expresado en *A. oryzae* bajo el control del promotor y péptido señal Taka amilasa y la proteína recombinante fue secretada en forma activa (Stewart y col., 1996).

Las peroxidasas ligninolíticas también se han tratado de producir usando sistemas de expresión en células de insectos, levaduras y ascomicetos (Conesa y col., 2002; Punt y col., 2002). Sin embargo, la mayoría resultó en enzimas sin actividad o con bajos rendimientos. Aunque hay excepciones que incluyen sistemas de expresión con *Aspergillus spp.* los cuales exhiben producciones de la enzima activa de 1–5 mg/l (Conesa y col., 2000), mientras que el mejor resultado (de hasta 100 mg/l de MnP de *P. chrysosporium*) fue obtenido en un sistema de expresión en *Aspergillus niger*. En este sistema, se usó una cepa hospedadora deficiente de una proteasa y el cultivo fue suplementado con 5 g/l de hemoglobina. La proteína recombinante MnP producida en el sistema mostro una movilidad inusual en SDS-PAGE, sugiriendo alteraciones en las cadenas glicosiladas. Además, cuando el mismo sistema se aplicó a LiP, no se produjo enzima activa (Conesa y col., 2000). La razón del fracaso para la producción de LiP no está clara, pero los autores proponen que podría ser más fácil

sobreprroducir MnPs en sistemas heterólogos comparados a LiPs, ya que, especialmente la última peroxidasa tiene alta reactividad y amplia especificidad de sustrato (Heinfling y col., 1998) cuya producción podría ser nociva al organismo hospedero comparado a las MnPs convencionales.

Entre los antecedentes directos de expresión heteróloga de peroxidasas cabe destacar que se cuenta con una cepa de *A. niger* que produce MnP y remueve PAHs con mejor eficiencia que la cepa silvestre en cultivo sumergido y sólido. La cepa transformante produce intermediarios diferentes que la cepa silvestre por efecto de la expresión heteróloga del gen *mnp1* (Cortés-Espinosa DV).

En lo que a VPs se refiere solo se han expresado en *E. coli* (Pogni y col., 2002) para llevar a cabo la caracterización de la enzima. Recientemente Tsukihaara y col., obtuvieron cepas modificadas genéticamente de *P. ostreatus* con una elevada productividad de MnP2 por transformación con un vector de expresión plpM2g que contenía la región codificante de *mnp2* bajo el control de un promotor y terminador homólogos de *sd1* (Tsukihara y col., 2006). *sd1* codifica para la subunidad Fe-S de la proteína succinato deshidrogenasa, uno de los componentes de la cadena respiratoria (Irie y col., 1998) con lo cual se esperaba que el gen recombinante *mnp2* se transcribiera constitutivamente. La cepa fue cotransformada con un plásmido que contenía un marcador de resistencia a carboxina, pTM1 (Honda y col., 2000). Para el análisis transcripcional de los genes *mnp2* tanto la cepa Silvestre y las recombinantes fueron inoculadas en YPG suplementado con extracto de paja de trigo, se realizó RT-PCR de los transcritos de *mnp2* endógenos y recombinantes usando el RNA total del micelio en el día 4. Según Tsukihara (2006b), la adición de extracto de trigo al medio YPG permitió mejorar la producción de MnP2 recombinante. También examinaron los efectos de otros suplementos como aserrín, celulosa, xilano, xilosa, ácido 5-aminolevrico y hemina sobre la producción de MnP en cultivos agitados. Sin embargo, solo se observaron estimulaciones limitadas, en donde de paja de trigo fue el mejor, sugiriendo que contiene factores estimulantes que no están contenidos en los otros suplementos. El mecanismo para la estimulación de producción de MnP2 por la paja de trigo necesita ser elucidada, aunque esté disponible como un residuo agroindustrial y comercialmente viable en términos de cultivo a gran escala para la producción de la enzima recombinante. Las enzimas recombinantes expresadas homológamente deberían tener estructuras y propiedades cinéticas idénticas a la enzima nativa, lo cual fue experimentalmente demostrado en este estudio. Las cepas recombinantes exhibían actividades de decoloración mejorada de Poly R-478 y remoción de benzo[a]pyreno, demostrando su alto potencial como biocatalizador en procesos biológicos. Sin embargo, la eficiencia de producción de las enzimas recombinantes extracelulares con actividad peroxidasa dependiente de Mn^{2+} fue de 230 U/l en cultivo estacionario. Bajo estas condiciones, una pequeña cantidad de MnP3, otra peroxidasa ligninolítica de *P. ostreatus*, fue también secretada concomitantemente con MnP2 (Tsukihara y col., 2006).

Un sistema similar de expresión recombinante en basidiomicetos fue aplicado a *Phanerochaete chrysosporium* para la producción exclusiva de MnP y LiP homóloga. Sin embargo la producción de cada proteína recombinante en este sistema fue de solo 2–3 mg/l. En contraste, en el estudio realizado por Tsukihara (2006b), se demostró

que hasta 21 mg/l (7300 U/l) de la peroxidasa versátil MnP2 se producía en un cultivo agitado de *P. ostreatus* conteniendo el gen recombinante *mnp2* dirigido por las señales de expresión de *sd11*. Aunque la expresión se analizó sólo en cultivo líquido, se espera que las señales de *sd11* sean convenientes para la expresión del gen recombinante en condiciones de buena aireación, en vista de que el gen endógeno *sd11* codifica una proteína de la cadena respiratoria. Las referencias anteriores comprueban que se ha logrado la sobreexpresión de diferentes peroxidases pero también la expresión heteróloga de VPs tiene ya antecedentes. Las cepas hospederas del cDNA *vpl* han sido hasta la fecha *A. nidulans* bajo el control del promotor *alcA* (Ruíz-Dueñas, 1999) y *A. niger* (Eibes G.M. y col., 2009).

Hasta el momento no se ha obtenido VP recombinante en un hospedero que tenga la capacidad de tolerar altas concentraciones de PAHs generalmente encontradas en suelos contaminados reales. Por lo tanto la expresión de VP en una cepa fungica aislada directamente de un suelo contaminado aseguraría su aplicación en sistemas de biorremediación.

7. JUSTIFICACION

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos han sido catalogados como carcinógenos y mutagénicos por la EPA, principalmente aquellos de alto peso molecular. Aunque son compuestos ubicuos, su depósito final es el suelo por su baja solubilidad acuosa y es el suelo precisamente el lugar donde se llevan a cabo actividades de gran importancia como lo es la filtración de agua a los mantos freáticos, la agricultura y otras actividades humanas. De ahí la necesidad de desarrollar sistemas de expresión de enzimas con la capacidad de degradar estos contaminantes.

El metabolismo de PAHs por hongos autóctonos del suelo los cuales no son linolíticos envuelve sistemas enzimáticos de monooxigenasa cP_{450} que da como resultado la formación de monofenoles, difenoles, y dihidrodioles como producto de oxidación mayoritario. Los dihidrodioles son metabolitos con una alta solubilidad acuosa y por lo tanto de mayor reactividad que los contaminantes iniciales. Gracias a eso tienen la capacidad de enlazarse covalentemente a cadenas de DNA. Por otra parte, los hongos ligninolíticos tienen la capacidad de oxidar PAHs hasta una completa mineralización gracias a un sistema enzimático muy completo a base de peroxidases como: MnP y LiP.

Las peroxidases versátiles (VPs) son enzimas que poseen dos sitios catalíticos. Uno de ellos se asemeja al que está presente en MnP y el otro es similar al de LiP. Por lo tanto las VPs tienen ventaja sobre MnP y LiP ya que algunos compuestos no son degradados por MnP por su bajo potencial redox. Las VP no solo tienen la capacidad de escindir el anillo aromático sino de hacerlo aun en la ausencia de mediadores, lo cual es una ventaja sobre MnP y LiP ya que con esta propiedad adquiere la capacidad de atacar compuestos tanto fenólicos como no fenólicos.

Desafortunadamente, el empleo de hongos ligninolíticos productores de peroxidasas, en procesos de biorremediación presenta varios problemas: uno de ellos es la producción de bajas cantidades de peroxidasas la cual se lleva a cabo en etapas específicas del ciclo de vida de este tipo de organismos como lo es la idiofase y además bajo ciertas condiciones como la baja concentración de nitrógeno. Aunque hongos como *P. Ostreatus* y *P. chrysosporium* poseen sistemas enzimáticos muy eficientes en la degradación de PAHs, con frecuencia no toleran las concentraciones tan altas de PAHs que contienen los suelos contaminados reales. Por otra parte el suelo no es su hábitat, sino la madera en descomposición, por lo que se puede correr el riesgo de que la microbiota autóctona del suelo los desplace, impidiendo su crecimiento y una eficiente biorremediación.

Es por todo lo anterior que la expresión de los genes que codifican para las peroxidasas versátiles en microorganismos nativos del suelo y el aumento de su producción en cultivo sólido podrían constituir un aporte importante en los sistemas de biorremediación de suelos contaminados con compuestos aromáticos.

8. OBJETIVOS

General.

Aislar cepas fúngicas de suelos contaminados con hidrocarburos y llevar a cabo una mejora genética, para la expresión del gen *vp12* que codifica para la VP de *P. eringii* y valorar su efecto sobre la remoción de fenantreno (Phe) y pireno (Py) en cultivo sólido.

Particulares.

- 1) Aislamiento e identificación de las cepas fúngicas, por técnicas de biología molecular.
- 2) Selección de una cepa fungica tolerante a altas concentraciones de Phe y Py y capaz de crecer en cultivo sólido.
- 3) Expresión heteróloga de *vp12* en la cepa seleccionada.
- 4) Determinación de la tasa de remoción de PAHs por la cepa fungica nativa y la transformada.

9. Materiales y Métodos

9.1 Aislamiento de hongos de suelos contaminados con hidrocarburos.

Uno de los inconvenientes en el aislamiento de hongos es la contaminación bacteriana. Por esta razón se utilizan diferentes técnicas de limpieza, desinfección, y antagonismo a los contaminantes. El uso de productos antagónicos incluye sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias como la estreptomicina, rosa de bengala, etc. Es importante escoger bien los medios de siembra. Cuando no se sabe la variedad que se aislará conviene utilizar diferentes medios. Los medios pobres en carbohidratos son convenientes en la observación e identificación, porque a menudo producen un desarrollo del micelio poco tupido el cual no interfiere con la observación de bacterias contaminantes e inducen al hongo a entrar antes a su fase reproductiva o de esporulación.

El aislamiento de hongos de suelos con frecuencia se basan en técnicas de excavación, extracción de parte del suelo para su almacenamiento y posteriores tratamientos del mismo como son el tamizado y en algunos casos lavados. Sin embargo en este trabajo se trato de obtener una colección fúngica representativa del suelo muestreado por lo que se trato de preservar en todo lo posible la población inoculando porciones de suelo directamente en viales con medio líquido. Los medios usados para este fin fueron un medio complejo YPG y un medio simple Czapek. Ambos con ampicilina en una concentración de 100 µg/mL para evitar el crecimiento de bacterias. Se muestrearon suelos contaminados con petróleo del sureste de México a profundidades de suelo de 20, 40, 60 80 y 100 cm.

Medio Czapeck (g L⁻¹): Glucosa, 10.0; KCl, 0.5; KH₂PO₄, 0.14; K₂HPO₄, 1.2; NaNO₃, 2.0; MgSO₄ 7H₂O, 0.5; FeSO₄, 0.01, pH 5-6 (Launen y col., 1995).

YPG (g L⁻¹): Extracto de levadura 3.0, Peptona 10.0, Glucosa 20.0, pH 4.5

El aislamiento primario se llevo a cabo en cultivo superficial en medio mínimo (MM), medio mínimo sin fuente de carbono (MM-FC) y medio YMG. Se vertieron 15 ml de medio estéril en placa, una vez solidificado se inocularon 200 µl del caldo de aislamiento. El inóculo se dejó incubar a 37°C por periodos de 48, 96 y 144 hrs.

Posteriormente se vertió nuevamente una cobertera de 10 ml del mismo medio estéril sobre la cual se adicionó dos mililitros de crudo maya en solución acetónica para seleccionar solo aquellas cepas con la capacidad de crecer ante tal contaminante. Una vez evaporada la acetona y fijado el contaminante sobre la superficie del medio las placas fueron incubadas nuevamente (Tabla 4). Solo aquellos microorganismos con la capacidad de tolerar altas concentraciones de hidrocarburos fueron capaces de crecer.

Tabla 4. Diseño experimental de aislamiento de hongos de suelo contaminado con hidrocarburos.

Profundidad de suelo Muestreado (cm)	Medio de selección	Tiempo de crecimiento para poner cobertera					
		48 h		96 h		144 h	
<i>Muestreo en Czapek</i>							
0-20	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
20-40	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
40-60	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
60-80	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
80-100	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
<i>Muestreo en YMG</i>							
0-20	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
20-40	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
40-60	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
60-80	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x
80-100	YMG	x	x	x	x	x	x
	MM	x	x	x	x	x	x
	MM-FC	x	x	x	x	x	x

Medio YMG (g L⁻¹): Extracto de levadura, 4.0; extracto de malta, 10.0; glucosa, 4.0, Agar 15 gr/ml solo para cultivo superficial.

Medio Mínimo (MM) (g L⁻¹): Glucosa, 10.0; (NH₄)₂SO₄, 7.0; KH₂PO₄, 5.7; K₂HPO₄, 2.0; MgSO₄ 7H₂O, 2.0. Para medio sólido se agregó agar bacteriológico, 15.0. Medio utilizado para la selección primaria y tolerancia en placa.

9.2. Identificación de los hongos aislados

En algunos casos, la microscopía permite no solamente detectar el hongo, sino identificarlo por medio de sus inconfundibles características morfológicas. Se emplean diversas tinciones para detectar y caracterizar directamente los hongos. Entre las características destacadas se encuentran la forma, el método de producción y la organización de esporas, así como el tamaño y el aspecto de las hifas. También la textura de las colonias filamentosas, color y topografía variables son observaciones que ayudan en la identificación.

9.2.1 Microcultivo

El microcultivo también se conoce como cultivo en portaobjeto. La técnica se realiza de la siguiente manera:

1. En la superficie de una caja de Petri se coloca un círculo de papel filtro y una varilla de vidrio delgada en forma de "V" con un ángulo y tamaño adecuado sobre la cual se coloca un portaobjeto. Este ensamble se debe esterilizar.
2. Se corta un cubo de PDA estéril de aproximadamente 1 cm² por 4 mm de profundidad y se coloca sobre la superficie del portaobjeto.
3. Con un asa estéril se remueven porciones pequeñas de colonia de hongos que se desea estudiar y se inocula en los cuatro cuadrantes laterales del bloque de agar. Luego de la inoculación, se coloca un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar. El papel filtro del fondo es humedecido con aproximadamente 5 ml de glicerol al 10 %.

La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjetos. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado y esta lista para su observación microscópica lo cual sucede con frecuencia a las 48 hr de incubación a 30 °C. Cuando es evidente el crecimiento, es recomendable inactivar con 5 mL de formaldehido. El cubreobjetos es retirado cuidadosamente con pinzas estériles y se coloca en un portaobjeto que contiene una gota de lacto fenol azul de algodón. Si se desea un montaje permanente, se limpia la superficie del portaobjeto adyacente al borde del cubreobjetos y se aplica inmediatamente esmalte para uñas color claro.

El ensamble se observó al microscopio desde un objetivo 10x, para observar las colonias, hasta 100x para observar detalladamente los conidióforos. La información obtenida se comparo con las descripciones existentes en literatura especializada.

9.2.2 Secuencias ITS

Los genes multicopia pueden presentar mayor sensibilidad en técnicas para la identificación de hongos. Los más utilizados son los del grupo de genes que codifican para el ARN ribosomal (5.8s, 18s y 28s) debido a que están evolutivamente muy conservados. Entre los genes que codifican para cada subunidad se encuentran secuencias internas llamadas ITS (Internal Transcribed Spacers) las cuales poseen variaciones entre especies e incluso dentro de la misma especie (Smit S., 2007). Las ITS flanquean al gen 5.8s: ITS1 (entre 18s y 5.8s) e ITS 2 (entre 5.8s y 28s) (Fig. 4).

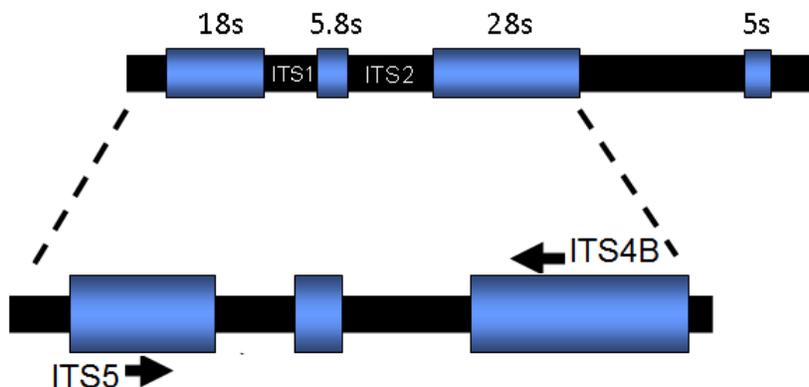


Fig. 4 Esquema de los genes par los rRNA 18S, 5.8S y 28S

Los cebadores específicos se basaron en las regiones conservadas 18s (ITS 5) y 28s (ITS 4B), para amplificar la región 5.8s.

- 1) ITS 5, 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAGG-3'
- (2) ITS 4B, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

Para llevar a cabo la amplificación de las secuencias ITS fue necesario extraer ADN total de cada cepa fúngica para lo cual se siguió el método descrito por Raeder y Broda (1985). Inicialmente se inocularon matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio YPG con 1×10^5 esporas los cuales se incubaron a 30°C durante 24 horas. El micelio obtenido se recolectó por filtración. Se lavó con 100 ml de solución de NaCl al 0.9% y posteriormente con 100 ml de agua destilada estéril. Se eliminó el exceso de agua al micelio y este se congeló a -80°C. Finalmente el micelio congelado se liofilizó y se maceró para someterse a un proceso de extracción de ADN.

Aislamiento del ADN total.

1. El micelio liofilizado se tritura y se pesan de 20-50 mg en un tubo Eppendorf y se agregan 500 µl de buffer HSD, agitándose con vortex 30 s.
2. Se agrega 50 µl de SDS al 10%, se mezcla lentamente por inversión del tubo y se incuban en baño de agua a 65°C durante 15 min.
3. Se agregan 500 µl de amortiguador TED. Se agitan los tubos por inversión.

4. La mezcla se desproteíniza mediante extracciones sucesivas agregando 600 µl de solución fenol-CIA. Se homogenizan los tubos por inversión lentamente durante 3 min. Se centrifugan 7 min a 12 000 rpm y 4°C, recuperándose la fase acuosa.
5. Se repite nuevamente el paso 4, hasta que se obtiene una interface limpia, no se necesitan más de dos fenolizaciones.
6. A continuación se hace una nueva extracción con un volumen de CIA, se mezcla 1 min y centrifugar 15 min a 12 000 rpm
7. Se extrae el sobrenadante, cuidando de no tocar ninguna de las otras dos fases inferiores y se agrega en un tubo Eppendorf nuevo. Se agrega 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 0.6 volúmenes de etanol absoluto, enfriado previamente a -20°C. Se mezcla suavemente para evitar el rompimiento del ADN.
8. Se centrifuga 15 min a 14 000 rpm y 4°C. Se tira el sobrenadante y se lava el precipitado con 500 µl de etanol al 70% (v/v) frío.
9. Se centrifuga a 4°C y 14.000 rpm durante 15 min; se desecha el sobrenadante y se evapora el etanol para secar el precipitado.
10. Se resuspende en 700 µL de TE y se añaden 5 µl de ARNasa, incubándose 30 min a 37°C.
11. Se agrega 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 0.6 volúmenes de etanol absoluto frío. Se repiten los pasos 8 y 9. y se resuspende el precipitado en 50 µL de H₂O estéril, grado HPLC.

Una vez extraído el ADN, este se analizó por electroforesis en gel de agarosa para observar la calidad del extracto. Se utilizó agarosa al 0.8 % (p/v) disuelta en tampón TAE. La concentración de agarosa utilizada depende del rango de tamaño de los fragmentos de ADN a separar. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio (BrEt) en una concentración final de 0.5 µg/ml (el BrEt se intercala en la doble cadena de ADN y permite su visualización tras iluminarse el gel con luz ultravioleta).

Con el ADN extraído se llevó a cabo la amplificación de las secuencias ITS por PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que sirve para la amplificación in vitro de secuencias de ADN específicas. La ADN polimerasa hace la síntesis de una hebra complementaria de ADN en dirección 5'→3' usando un molde de cadena sencilla, pero comenzando en una región de doble cadena. La PCR usa el mismo principio pero emplea 2 cebadores cada uno complementario a la hebra opuesta de la región de ADN, la cual ha sido desnaturalizada

por calentamiento (Mullis y Faloona, 1987). La mezcla de reacción se preparó en un tubo Eppendorf de 200 µl adicionando los siguientes reactivos.

H ₂ O estéril HPLC	36.5 µl
Tampón 10x para la enzima	5.0 µl
Mezcla de nucleótidos	1.0 µl
Cebador I (20 µM)	1.0 µl
Cebador II (20 µM)	1.0 µl
ADNc molde (50 ng/µl)	5.0 µl
Enzima (2.5 U/µL)	0.5 µl
<hr/> Vol. Final	<hr/> 50.0 µl

Aunque el protocolo es sencillo se recomienda limpiar con hipoclorito la superficie de trabajo, preparar la reacción teniendo en cuenta que la pre-mezcla o reacción con todos los componentes, a excepción del ADN blanco, se debe preparar en un área dispuesta sólo para este fin, con un juego de pipetas de uso exclusivo para PCR y de ser posible, usar puntas con filtro. Es recomendable usar guantes nuevos. Una vez adicionado el ADN la mezcla debe mezclarse ligeramente y centrifugarse por unos 10 seg e inmediatamente colocar en el termociclador; correr el programa adecuado según el tamaño del fragmento a amplificar y la T_m de los cebadores. Finalmente, se debe tener en cuenta que los reactivos y materiales de la reacción de PCR se mantienen separados de los demás elementos del laboratorio y sólo se destapan en el cuarto de PCR. El tubo con la mezcla para PCR se introdujo en un termociclador BIORAD y se puso en marcha un programa con las siguientes condiciones.

1 ciclo a 94°C durante 5 minutos	Desnaturalización.
<hr/> Se aplicaron 30 ciclos más como se describe:	
<hr/> 1. Desnaturalización:	94°C, 1 min.
2. Hibridación:	50°C, 1 min.
3. Elongación:	72°C, 45 s.
<hr/> Un último ciclo de 7 minutos a 72°C.	

La concentración de ADN molde se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg de ADN. Por ello, se pusieron 5 µl del AND de cada una de las cepas, para obtener una concentración final de 200 ng/µl.

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 0.8 % (utilizando un voltaje de 90 V) y las bandas de aproximadamente 700 pb, que corresponden a la región ITS1-5.8s-ITS2, se purificaron utilizando el Kit

QIAquick de Qiagen[®] y finalmente se resuspendieron en el volumen apropiado de agua para su posterior secuenciación. El análisis in silico de las secuencias se realizó por comparación con la base de datos de NCBI. La construcción de árboles filogenéticos y matrices de identidad se realizaron en DNASTar.

9.3 Pruebas de tolerancia a PAHs

Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen cantidades variables de PAHs que puede alcanzar concentraciones de hasta 10,000 ppm o más. Por lo tanto para la biorremediación de este tipo de suelos se requiere la aplicación de cepas fúngicas que tengan la capacidad de tolerar altas concentraciones de PAHs. La selección primaria se llevo a cabo mediante un experimento en donde se sometió cada una de las 37 cepas aisladas a una mezcla de PAHs a base de Phe y Py. Este sistema de selección se aplico para evitar el desplazamiento que sufren actualmente los hongos de pudrición blanca cuando son aplicados en sistemas de biorremediación pues la mayoría de ellos no toleran concentraciones mayores a las 200 ppm de PAHs. La tolerancia del microorganismo al contacto directo con una mezcla de PAHs provee un filtro de selección de cepas fúngicas que pueden aplicarse posteriormente a sistemas de biorremediación de suelos contaminados. La variable de respuesta en el experimento fue la velocidad de crecimiento radial la cual fue medida cada 24 horas. Al mismo tiempo se realizaron observaciones sobre la morfología colonial en respuesta al aumento de concentración de PAHs y al paso del tiempo con respecto a un control que incluía el cultivo de la cepa en cuestión pero sin contaminante. El experimento se realizó de la siguiente manera:

1. Se prepararon placas de Petri con 25 mL de medio MM.
2. Cuando las placas ya estaban solidificadas se agregó en la superficie 2 mL de una mezcla de PAHs en solución acetónica, lo cual fue suficiente para inundar la superficie de la placa. Las placas se dejaron abiertas en una área estéril pero sin mecheros y sobre una superficie nivelada para evaporar la acetona. Por sus características fisicoquímicas (Tabla 1), los PAHs tienden a fijarse a las superficies sólidas con lo cual existe la seguridad de que la cantidad de contaminante presente en la mezcla quedara impregnado sobre el gel.
3. Las placas, una vez evaporadas, se inocularon inmediatamente en el centro con 5 μ L de una solución de 1×10^7 esporas. Se incubaron a 30°C durante 15 días y se hicieron mediciones del crecimiento radial (Vcr) cada 24 h. Como control se usaron placas sin PAHs inoculadas con cada una de las cepas de igual manera. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado para su posterior análisis estadístico.

Para la selección primaria se usaron concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm para medir la máxima tolerancia la mezcla de PAHs.

9.4 Cultivo sólido.

El cultivo sólido o fermentación en estado sólido (SSF) tiene un gran potencial para la producción de enzimas. Lo cual es de gran interés en los procesos donde el producto crudo de la fermentación puede ser usado directamente como fuente de enzima. Este es precisamente el caso de la biorremediación "in situ". La biorremediación está definida como un proceso que usa microorganismos o sus enzimas para devolver al ambiente alterado por contaminantes sus condiciones originales, es un proceso atractivo debido a su bajo costo y el beneficio de la mineralización de los contaminantes a CO₂ y H₂O.

9.4.1 Estandarización de las condiciones de crecimiento de las cepas fúngicas seleccionadas en cultivo sólido.

El cultivo sólido ofrece numerosas ventajas como son los grandes volúmenes de producción, mayor concentración de los productos, menos generación de efluentes y requerimientos simples de equipo. La fermentación por hongos en cultivo sólido permite el uso de residuos agroindustriales como son la cascarilla de arroz y de trigo, residuos de maíz y soya así como cascara de coco y nueces. En este estudio se utilizara el bagacillo de caña para estandarizar las condiciones de crecimiento en cultivo sólido de cuatro cepas aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos.

Entre los factores importantes para el crecimiento de los hongos sobre un residuo agroindustrial están el tamaño de la partícula y la humedad es un aspecto crítico. Generalmente las partículas pequeñas del sustrato proveen una superficie de contacto mayor para el ataque de los microorganismos. Sin embargo, una partícula muy pequeña del sustrato puede provocar la aglomeración la cual interfiere directamente con la aireación del sistema y por lo tanto con la respiración microbiana lo cual provoca un crecimiento pobre del microorganismo. Por eso, el bagazo de caña se molió y se tamizó. Los polvos se desecharon y solo se recuperó un tamaño de partícula de bagacillo de caña que traspasa una malla #20. Otro de los factores que pueden afectar el crecimiento de hongos no linolíticos en residuos agroindustriales es el retratamiento del sustrato, por lo que fue necesario llevar a cabo una hidrólisis alcalina para deslignificar el sustrato y que los nutrientes estuvieran biodisponibles.

1. Después de tamizar el bagacillo de caña este fue lavado con una solución de NaOH 0.5 M durante 2 h a 40°C y 250 rpm.
2. El tratamiento de hidrólisis alcalina se repitió hasta que se obtuvo un sobrenadante más claro. El bagacillo de caña se lavo con agua destilada hasta que alcanzo un pH de 7.

- Cuando el bagacillo de caña estuvo libre de NaOH, se colocó en charolas dentro de una mufla a 50°C por 3 días o hasta haber removido completamente la humedad.

La estandarización de las condiciones de crecimiento de las cepas aisladas en cultivo sólido se llevó a cabo en microcosmos, la cual es una técnica que semeja el cultivo sólido “in situ” pero a pequeña escala y con todos los parámetros controlados para tener un mayor acercamiento de la dinámica del sistema. Para este efecto se utilizaron frascos serológicos de 100 ml con 0.35 gr de bagacillo de caña.

El tamaño del inoculo también es un factor importante, en este caso se utilizara un inoculo de 2×10^7 esp/gr de bagazo húmedo. Para que los hongos comiencen a producir las enzimas que les ayuden a metabolizar el residuo agroindustrial deben haber crecido primero, por lo que se hace necesario el suplemento de una fuente primaria de carbono. Bajo este contexto se probarán tres diferentes medios, los cuales han sido ya utilizados para el crecimiento de hongos variando el contenido de humedad inicial entre 30 y 40 %, el cual se ajustará con el mismo medio concentrado 3X. Los controles serán los frascos solo con bagacillo de caña sin inocular. Los cuales servirán como prueba de que solo los microorganismos inoculados están creciendo dentro del microcosmos. Por lo tanto en los controles no debe haber producción de CO₂. El diseño experimental para seleccionar la fuente primaria de carbono se esquematiza en la tabla 8.

Tabla 8. Diseño experimental para la selección de la fuente primaria de nutrientes.

Cepa fúngica	Medio Mínimo	Toyama´s	Medio Mínimo 2	Humedad
<i>Aspergillus Terreus</i>	X X	X X	X X	30%
<i>Talaromyces spectabilis</i>	X X	X X	X X	
<i>Scedosporium apiospermum</i>	X X	X X	X X	40%
<i>Fusarium proliferatum</i>	X X	X X	X X	

El crecimiento en medio mínimo de los hongos aislados no cambia mucho al crecimiento observado en PDA. Tanto el medio Toyama´s como el medio mínimo 2 no han sido probados en este laboratorio para estos hongos. Sin embargo dos de las cepas aisladas, *Scedosporium apiospermum* y *Talaromyces spectabilis*, han sido cultivadas en el medio mínimo 2 (Estévez y col., 2005; García Peña, 2001). Las composiciones de los medios a evaluar se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Composición de medios para cultivo sólido.

gr L ⁻¹	Medio Mínimo	Toyama´s	Medio Mínimo 2

Glucosa	10	10	10
(NH₄)₂SO₄	7	10	
KH₂PO₄	5.7	3	4.5
K₂HPO₄	2		0.5
MgSO₄ 7H₂O	2	0.5	0.1
CaCl₂ 2H₂O		0.5	
NH₄Cl			2

La remoción del calor producido por la actividad metabólica se tiene que hacer mediante aireación con aire estéril húmedo por cinco minutos todos los días lo cual además removerá el CO₂ producido y suministrara O₂. El periodo de cultivo será de 15 días a lo largo de los cuales se tienen que mantener parámetros como la humedad y el oxígeno. Los viales tienen que sellarse con un tapón de goma y anillo de aluminio para seguir la cinética de crecimiento mediante la cuantificación de CO₂.

Medición de la actividad Heterotrófica

La actividad respiratoria de los microorganismos en microcosmos se evaluó mediante la evolución de CO₂ medido diariamente. El espacio libre de cada frasco se removió todos los días por 15 min con aire estéril, húmedo y libre de CO₂. Esto permitió conservar las condiciones aeróbicas (Rodríguez-Vázquez 1999). La cuantificación de CO₂ se llevo a cabo por titulación (Serrano-Silva y col., 2009). Cada microcosmos se adapto a una trampa de CO₂ que contenía 10 ml de NaOH 1.0 M. La solución trampa NaOH–CO₂ fue analizada para determinar el contenido de CO₂ mediante la adición de BaCl₂ 0.1 M. Después de la adición de BaCl₂ se observo la aparición de un precipitado que corresponde a la formación de BaCO₃ como indicativo de la recuperación de CO₂, la solución fue centrifugada y el sobrenadante se transfirió a un matraz, seguido de la adición de 2 gotas de fenolftaleína 1 M en solución etanólica. El exceso de NaOH en la trampa se tituló con HCl 1.0 M y la cantidad de CO₂ producida por cada microorganismo durante la respiración fue calculada estequiometricamente la cual fue inversamente proporcional al volumen de HCl usado en la titulación. Este procedimiento se repitió cada día por 2 semanas. La respiración se determino como la actividad microbiana reportada como mg de CO₂ por g de materia seca inicial (IDM).

9.4.2 Remoción de Phe y Py en cultivo sólido por las cepas seleccionadas.

La eficiencia de remoción de una mezcla de Phe y Py por las cuatro cepas seleccionadas se evaluó en cultivo sólido usando bagacillo de caña como soporte del crecimiento fúngico y fuente alterna de carbono para la producción del inóculo en microcosmos. El bagacillo de caña estéril (0.35 g) se humedeció con 2 ml de medio

Toyama's y se inoculo a una concentración final de 2×10^7 esporas g^{-1} of bagacillo húmedo inicial. Posteriormente se adicionaron 6.65 g de suelo estéril contaminado con 2000 mg PAHs kg^{-1} suelo de una mezcla de Phe y Py (1:1). El suelo contaminado fue adicionado cuando los hongos estaban en el inicio de la fase exponencial. Los hongos se incubaron a 30°C por 14 d. Los controles se prepararon con suelo no contaminado pero inoculado. Los controles abióticos se incluyeron para asegurar que la remoción de los PAHs fuera causada por la biodegradación. Estos controles también sirvieron para compensar las pérdidas causadas por la adsorción. Los matracos fueron sellados con tapas de goma hermética y anillos de aluminio. Cada ensayo se realizó por duplicado (Tabla 10).

Tabla 10. Diseño experimental para la evaluación de remoción de PAHs por las cepas seleccionadas

	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Talaromyces spectabilis</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
Unidades	X X	X X	X X	X X
CTRL biótico	X X	X X	X X	X X
CTRL abiotico	X X		X X	X X
Humedad	30 %		35 %	40%
Medio	Toyama's			
[Phe:Py]	2000 ppm			

Analisis del Phe y Py remanentes

La extracción por Soxhlet ha sido ampliamente usada como un técnica de referencia en la extracción de PAHs de suelos y sedimentos. Básicamente, en esta técnica, la muestra sólida se sitúa en un dedal de extracción el cual es extraído usando un solvente apropiado a través de un ciclo de reflujo. Una vez que el solvente esta en ebullición, el vapor pasará a través de un brazo dentro del condensador, donde se formaran gotas que regresaran nuevamente al dedal (Lau y col., 2010).

La principal desventaja en este proceso de extracción es el uso de grandes volúmenes de solvente, el cual puede ser mayo de 150 ml para la extracción de PAHs de una muestra de 10 g. Además, este método es muy laborioso y tardado, ya que el solvente tiene que ser recirculado hasta por 2-24 h en el peor de los casos para alcanzar eficiencias de extracción considerable (Guerin 1998; Dean y Xiong 2000).

Otra técnica es la extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) donde ambos solvente y muestra están sujetos a calentamiento por radiación. Las radiaciones de microondas se prefieren sobre el

calentamiento convencional debido a su rapidez, reproducibilidad y a que tiene menor pérdida de energía. Los diseños modernos de los hornos de microondas incluyen carruseles los cuales pueden tener por lo menos 12 vasos de extracción permitiendo el procesamiento simultaneo de múltiples muestras. La principal ventaja del método MAE son las reducciones en el solvente (~30 ml) y el tiempo (~10 min) (Letellier y col., 1999). El mayor inconveniente de este método es que el solvente necesita ser removido físicamente en su totalidad de la muestra extraída antes de realizar más análisis (Lau y col., 2010). Aun así, el método MAE produce eficiencias (84-100%) similares a la extracción por Soxhlet (Smith y col., 2006), extracción por fluidos supercríticos (SFE), extracción acelerada por solventes (ASE), y los métodos ultrasónicos, pero con desviaciones estándar relativamente más bajas (Flotron y col., 2003; Saim y col., 1997; Berset y col., 1999)

En el proceso de MAE, llevados a cabo en vasos cerrados, los parámetros más importantes que controlan el procedimiento están la naturaleza del solvente (Mandal y col., 2007), el tiempo de irradiación y la energía de microondas administrada. Estos parámetros deben ser seleccionados cuidadosamente con el objetivo de obtener la mayor recuperación en el menor periodo de tiempo, pero también evitando la sobrepresión lo cual puede causar fugas y pérdidas del analito (Piñeiro-Iglesias y col., 200).

Cuando se selecciona el solvente, se deben tener ciertas consideraciones respecto su capacidad de absorción de microondas y a la solubilidad del analito en el solvente. Con el objetivo de mejorar la absorción de la energía de microondas, los solventes con una constante dieléctrica cercana al agua, metanol y acetona son aplicados preferentemente. Las temperaturas de diferentes solventes que se obtienen con calentamiento por microondas bajo condiciones de MAE se esquematizan en la fig.5

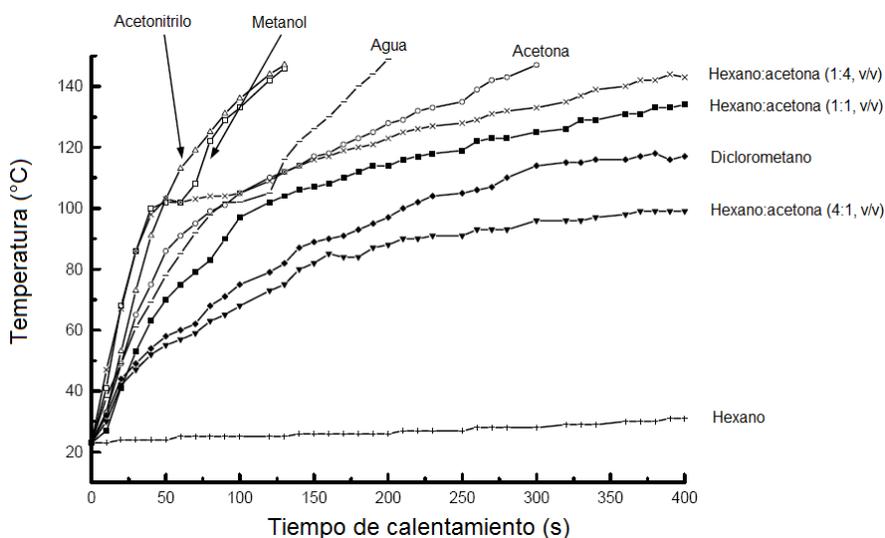


Fig. 5 Temperaturas de algunos solventes bajo condiciones de MAE

Es claro que entre más grande es la constante dieléctrica de el solvente, mas rápido es el calentamiento bajo la irradiación de microondas. Sin embargo, en algunos casos los solventes con una constante dieléctrica alta hacen laborioso el paso de la concentración después de la extracción debido a su inherente alto punto de ebullición por lo que raramente se utiliza agua como solvente. Aunque el metanol puede causar interacciones dipolo inducidas con los numerosos electrones π sobre los PAHs debido a su dipolo permanente, la baja solubilidad de los PAHs en metanol resulta en una baja recuperación (Tabla 11).

Tabla 11. Eficiencia de extracción por MAE de diferentes analitos con diferentes solventes

Analitos	Recuperacion (%) \pm RSD (%) n=4			
	Metanol	Hexano-acetona (1:1)	Diclorometano	
PAHs	Naftaleno	64.4 \pm 7.5	79.0 \pm 4.1	78.3 \pm 3.3
	Fenantreno	60.9 \pm 6.2	85.1 \pm 5.8	83.8 \pm 2.9

Un solvente que ha dado altos porcentajes de recuperación es el diclorometano pero debido a que es un compuesto clorado su uso es poco recomendable (Tabla 12). Por lo tanto, una mezcla hexano-acetona es ideal para compuestos con importancia ambiental. Por ejemplo, el hexano cuya constante dieléctrica de 1.8 no se calentara mientras que mezclándolo con acetona el calentamiento se llevara a cabo en unos cuantos segundos. Además debido a la solubilidad de los PAHs en esta mezcla de solventes la formación de dipolos permanentes asegura la absorción de la radiación de microondas, lo cual se considera favorable para acelerar la extracción.

Tabla12. Eficiencia de extracción con diferentes solventes.

Solvente	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Temp (°C)	Watts	MHz	Eficiencia (%)	Autor	Año	Observaciones
Diclorometano	30-40	10		30	2450		Buco y col.	2004	Solvente clorado. Toxico
Hexano-acetona 1:1	15	20		400		96-98	Piñeiro-Iglesias	2000	Si mejora con el tiempo
Heptano-etanol 8:2	10	2.0		140		100	Letellier	1999	Mejor que el diclorometano
Diclorometano-acetona			180			88.5	Saleh y Sanagi		
Ciclohexano-acetona 3:2		15				96.55	Bangkedphol y col.		

Estudios preliminares basados en datos obtenidos de experimentos de un solo parámetro han permitido la selección de parámetros importantes en la extracción MAE como son el poder, la humedad de la matriz, el tiempo de irradiación, el volumen y el solvente.

El poder es un parámetro que no se puede variar pues en nuestro caso esta dado por el fabricante (Anton Paar Microwave 3000 SOLV) y depende del número de vasos en el carrusel así como el volumen (30 mL). La humedad de la matriz es eliminada mediante exposición a 40°C. Por lo tanto en este estudio solo se harán cambios en el solvente así como en el tiempo de irradiación.

Basado en todas estas consideraciones, se aplicaran la proporción de 1:2 en la mezcla hexano-acetona, esta mezcla rebaza el calentamiento del diclorometano (Fig 5). La temperatura esta dada por la presión que soporta el equipo y será de 140°C y los tiempos de exposición serán 3 diferentes y mayores a 30 min. El diseño experimental que se aplicara se esquematiza en la tabla 13.

Tabla 13. Diseño experimental de estandarización de condiciones de extracción por MAE

Tiempo (min)	40	50	60
Hexano-acetona 1:1	X X	X X	X X
Hexano-acetona 1:2	X X	X X	X X
Volumen solvente	30 ml		
Temperatura	140 °C		

9.5 Screening de enzimas oxidativas extracelulares por decoloración en placa

Las dos cepas fúngicas, *A. terreus* y *T. spectabilis*, candidatas para llevar a cabo la expresión heteróloga del gen *vpl2* se han elegido debido a la alta tolerancia que presentan frente a concentraciones de mas de 1000 ppm de Phe y Py. También se les ha hecho crecer en fermentación en estado sólido con bagacillo de caña como soporte y lo han invadido. Además la adición de suelo contaminado con PAHs al cultivo no ha mostrado ser letal para los microorganismos. La disminución de los PAHs iniciales debido al metabolismo microbiano indica la presencia de enzimas oxidativas en el medio. Por tanto un sondeo del tipo de enzimas oxidativas extracelulares de las cepas en cuestión es muy pertinente.

La información con respecto a las peroxidasas extracelulares de los hongos de pudrición blanca es conocida actualmente y algunos investigadores han avanzado en el análisis de condiciones de crecimiento, de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos, que sean más similares al sustrato ligninocelulosico. Estos análisis no solo proveerían información relevante acerca del nicho natural sino que también proporcionarían una base para comparar los resultados obtenidos de sistemas de cultivo líquido y de sustratos naturales de crecimiento (Cohen y col., 2002).

Los hongos no son capaces de utilizar PAHs como única fuente de carbono y energía sino más bien de llevar a cabo una oxidación de estas moléculas bajo condiciones cometabólicas (Bazelel y Cerniglia 1996).

Taxonómicamente, los hongos de pudrición blanca son en su mayoría basidiomicetos, aunque se ha encontrado que algunos ascomicetos tienen la capacidad de llevar a cabo pudrición blanca en madera. Sin embargo, no se sabe con exactitud si sus enzimas oxidativas realmente pertenecen al sistema enzimático de cP450 (Eaton y Hale, 1993) o a un sistema enzimático similar al de los hongos ligninolíticos que producen Lac, MnP, LiP o VP, las cuales son las principales enzimas oxidativas de lignina incoloradas también en la degradación de xenobióticos por los hongos de pudrición blanca (Wesenberg y col., 2003). Bajo este contexto se hace necesario el desarrollo de una técnica de identificación de enzimas oxidativas extracelulares similares a MnP, LiP, Lacasas y peroxidasas versátiles (VPs).

Para esta prueba, se utilizaron las cepas silvestres de *Aspergillus niger* como control negativo, ya que esta cepa no presenta actividad de peroxidasas; *P. chrysosporium* se usó como control positivo, debido a la alta actividad catalítica de peroxidasas (MnP y LiP), *Pleurotus ostreatus* se usó como control positivo para peroxidasas versátiles, lacasa y MnP.

La LiP cataliza la oxidación dependiente de H_2O_2 de compuestos no fenólicos tales como el alcohol veratrílico a veratrilo aldehído. Por lo tanto la única característica de esta enzima es que es capaz de oxidar compuestos aromáticos con potenciales redox más allá del alcance de la peroxidasa de rábano y otras peroxidasas en un pH extremadamente bajo de 2.5-3 (Schoemaker, 1990). En general las soluciones amortiguadoras para las enzimas se hacen a partir de ácidos débiles y su base conjugada para asemejar in vitro las condiciones fisiológicas producidas en los hongos por lo cual se utilizará una solución amortiguadora de tartrato de sodio 100 mM pH3. El primer sustrato en la reacción ping-pong de LiP es un producto de una enzima accesorio como es el H_2O_2 el cual activa el ciclo catalítico. La enzima activada oxida alcohol veratrílico, un metabolito secundario natural de los hongos, el cual actúa como mediador redox para estimular la oxidación catalizada por LiP de un amplio rango de compuestos recalcitrantes. La concentración final del alcohol veratrílico como mediador será de 2 mM. La oxidación por LiP depende de una razón molar óptima entre el H_2O_2 y el contaminante. A bajas concentraciones, el H_2O_2 es un activador de LiP, mientras que a concentraciones altas es un inhibidor y desactiva rápidamente la enzima (Lan y col., 2006). Las concentraciones utilizadas están en el rango de 0.1 – 4.0 mM. En este estudio se aplicará una concentración de 0.4 mM ($\approx 0.02\%$) de H_2O_2 . La LiP de *P. chrysosporium* es inhibida por EDTA y TEMED. Aunque un exceso de Zn^{2+} puede revertir esta inhibición. Los colorantes con los que se cuenta, y que se presume tienen alto potencial redox por el tipo de su estructura, son: cristal violeta (trifenil metano), azul de metileno (benceno metilado), azure B y el azul brillante de remazol (antraquinona) este último posee grupos secuestradores de electrones α -carbonilo que tienden a desactivar el anillo aromático lo que los hace más difícil de atacar. La razón H_2O_2 : contaminante será de 1:1 por lo que la concentración del colorante será de 0.02 %.

El ión Mn^{2+} , suministrado por $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2 mM en este estudio, desempeña el papel de cofactor para MnP. El MnP^{3+} es liberado de la enzima en complejo con un oxalato o con otros quelantes (Sundramoorthy y col., 2005). Junto con el pirofosfato, otros quelantes que mejoran la actividad son el malonato, oxalato, L-tartrato,

oxalacetato, L-malato y metilmalonato (Mäkelä y col., 2005). El agente quelante para evaluar la actividad manganeso dependiente será tartrato de Na 100 mM pH 4.5. La MnP puede utilizar además de H₂O₂ varios hidroperóxidos orgánicos, tales como el ácido peracético, ácido *m*-cloroperoxisbenzoico, y el ácido *p*-nitroperoxibenzoico, como fuentes equivalentes de oxidantes. Sin embargo, el oxidante disponible en este estudio es H₂O₂ 0.02 % y un 0.02 % de colorante. Los colorantes reportados para identificar rápidamente MnP son de tipo fenólico. Entre ellos se cuenta con el rojo fenol, azul de bromotimol pero tanto el Poly R-478 como la ortoanizidina han mostrado una rápida decoloración en placa por MnP.

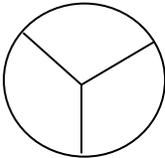
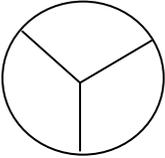
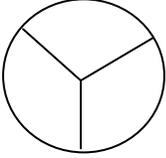
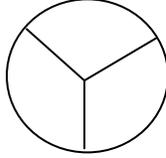
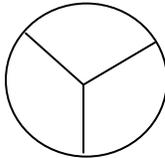
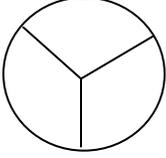
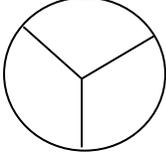
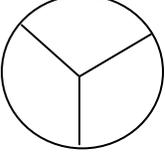
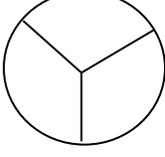
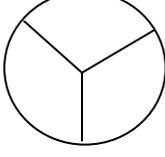
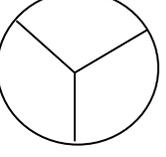
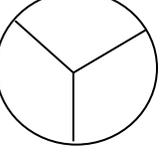
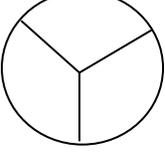
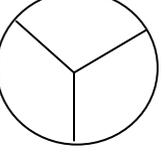
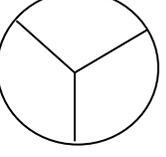
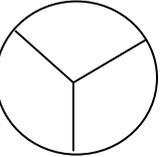
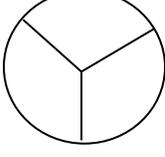
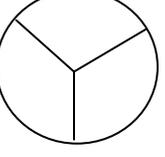
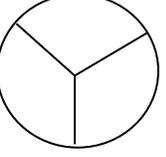
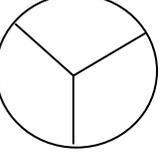
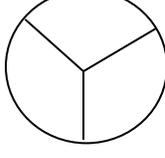
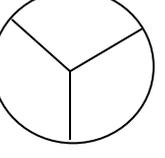
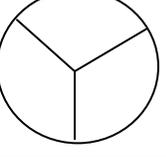
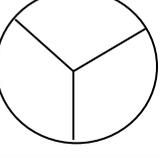
El pH óptimo de las lacasas varía de 2 a 10. Para este estudio se considerará un pH de 4.5 el cual se fijará mediante una solución de tartrato de sodio 100 mM. Varios metabolitos fúngicos como el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonate) y el DMP (2,6-dimetoxifenol) desempeñan el papel de mediadores de lacasa y mejoran la degradación de contaminantes. Sin embargo la lacasa de *T. versicolor* ha mostrado ser más efectiva sin el uso de un mediador. Bajo este contexto la identificación de lacasa se llevara a cabo sin mediador. Aunque el Poly R- 478 no es un colorante fenólico se ha reportado que la lacasa de este hongo decolora efectivamente este compuesto en la ausencia del ión manganeso y sin H₂O₂. Se ha reportado que la adición de Cu, Cd, Ni, Mo y Mn incrementan la actividad de lacasa de los hongos de pudrición blanca. En contraste, la adición de Ag, Hg, Pb, Zn, azida de sodio, cloruro de sodio y H₂O₂ inhiben su actividad (Asgher M., y col., 2008).

La peroxidasa versátil oxida no solo Mn²⁺ sino también alcohol veratrilico, compuestos aromáticos de alto peso molecular fenólicos y no fenólicos incluyendo colorantes en reacciones independientes de manganeso (Kamitsui y col., 2004; Pogni y col., 2005). Las VPs han sido encontradas en los géneros *Bjerkandera* y *Pleurotus*. Para este estudio se cuenta con la cepa *P. ostreatus* la cual debería oxidar tropaeolina (azoico), cristal violeta, azul brillante de comassie (trifenilmetanos) o azul brillante de remazol R (antraquinona) todos ellos sin Mn²⁺ o alcohol veratrilico como mediador en un pH de 3 o 4.5, respectivamente.

Las tres cepas nos ayudaran a seleccionar el colorante para la prueba cualitativa siguiendo los experimentos detallados en la tabla 14.

El inoculo será un cilindro de cualquiera de los 14 medios de prueba (Tabla 16-29) invadido con la cepa control con una edad máxima de 24 hr de crecimiento. Para el screening tanto de MnP como de Lac, los componentes se disolverán en una solución amortiguadora de tartrato de sodio 100 mM pH 4.5. Para el screening de LiP los componentes se disolverán la misma solución amortiguadora pH 3. El medio para inmovilizar el colorante será compuesto de agar noble al 1 % y glucosa 2 g L⁻¹.

Tabla 14. Diseño experimental para el screening de peroxidasas

	MnP	LiP	VP	Lacc
<i>P. chrysosporium</i>				
<i>P. ostreatus</i>				
<i>A. niger</i>				
<i>A. terreus</i>				
<i>T. spectabilis</i>				
Control abiotico				
	O-anizidina	Azure B	RBBR	ABTS

El screening se llevo a cabo en placas de tres divisiones con un volumen final de 9 ml con una concentración de 0.02% de colorante, a excepción de Azure B que se utilizo a 0.0033 %, esterilizados por filtración. La mezcla de reacción es especial para la identificación de una enzima. Incluye un sustrato inicial (H₂O₂), y en el caso de MnP la adición del ion manganeso (Tabla 15). Todos diluidos en buffer de tartrato de sodio 100 mM en el pH correspondiente.

Tabla 15. Mezclas de reacción de peroxidasas

	MnP	LiP	VP	Lacc
pH	4.5	3.0	3.0	4.5
Tartrato de sodio [0.9 M]	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
MnSO ₄ H ₂ O [18 mM]	1 mL	-----	-----	1 mL
Alcohol veratrilico [18 mM]	-----	1 mL	1 mL	-----
CuSO ₄ [13.5 mM]	-----	-----	-----	1 mL
Agar [1.8%]	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Colorante [0.18%]	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
H ₂ O ₂ [36 mM]	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Los cilindros de 14 medios diferentes (Tabla 16-29) se inocularon con 5 µL de una solución de esporas de 1×10^7 esporas mL⁻¹. *Pleurotus ostreatus* se inoculo cortando un disco de pleura la cual se situo en la superficie del cilindro. Los cilindros inoculados se incubaron a 30°C durante 24 h. *Phanerochaete chrysosporium* se incubo a 37°C.

Tabla 16. Medio Rico p/Basidiomicetos

Componente	[g L ⁻¹]
NH ₄ NO ₃	0.724
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
KCl	0.5
Extracto de levadura	0.5
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.001
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0028
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.033
Glucosa	10.0
Peptona	10.0
pH	6

Bezalel y col., 1997

Tabla 17. Medio Kirk modificado

Componente	[g L ⁻¹]
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05
CaCl ₂	0.01
Tiamina	0.0025
NH ₄ NO ₃	0.724
Glucosa	10.0
pH	6.0

Kirk y col., 1986

Tabla 18. Medio Básico

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	5.0
L-asparagina	2.5
NaNO ₃	3.0
KCl	0.5
KH ₂ PO ₄	0.45
Na ₂ HPO ₄	0.17
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
Tiamina	0.0005
CuSO ₄	0.0005
MnCl ₂	0.01
ZnSO ₄	0.002
FeSO ₄	0.005

Lindeberg and Holm, 1952

Tabla 19. Medio N-limitado

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	5.0
L-asparagina	0.25
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
KH ₂ PO ₄	0.45
Na ₂ HPO ₄	0.17
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
Tiamina	0.0005
CuSO ₄	0.0005
MnCl ₂	0.01
ZnSO ₄	0.002
FeSO ₄	0.005

Lindeberg and Holm, 1952

Tabla 20. Medio Sintetico

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	10.0
NH ₄ NO ₃	2.0
KH ₂ PO ₄	0.8
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0.75
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
Extracto de Levadura	2.0
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.002
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.005
CaCl ₂	0.06
CuSO ₄ 7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ H ₂ O	0.05
pH	6

Stajic y col., 2004

Tabla 21. Medio N-limitado FPC

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	10.0
KH ₂ PO ₄	0.2
CaCl ₂	0.11
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.264
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0425
MnSO ₄ H ₂ O	0.175
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.007
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.007
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.0009
NaCl	0.0009
Extracto de levadura	0.2
Alcohol veratrilico	0.07
Acido tartarico	3.0
Tween 80	1.0
pH	4.5

Grgič y col., 2001

Tabla 22. Medio Mínimo

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	2.0
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	1.0
KH ₂ PO ₄	0.26
Na ₂ HPO ₄	0.26
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.01
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.0066
FeSO ₄	0.005
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.005
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.0002
MnCl ₂ 2H ₂ O	0.00009
H ₃ BO ₃	0.00007
Extracto de malta	2.0
pH	5.5

Tabla 23. Medio ME

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	20.0
Extracto de malta	20.0
Polipeptona	2.0
pH	5.0
Hadibarata y col.,	2012

Tabla 24. Medio Enriquecido

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	5.0
KH ₂ PO ₄	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
Extracto de Levadura	0.2
pH	5-6

Yang y col., 2003

Tabla 25. Medio 1

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	10.0
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	0.22
KH ₂ PO ₄	0.9
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05
Tiamina	0.001
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0008
H ₂ MoO ₄	0.0005
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.0007
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.043
Fe(SO ₄) ₃	0.0005
Chao y Lee, 1994	

Tabla 26 . Medio TDM

Componente	[mM]
Glucosa	33
NH ₄ Cl	15
NaCl	5
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄	1
CaCl ₂	0.1
2,2-dimetilsuccinato	10
Tiamina	8
FeSO ₄	0.02
CuSO ₄	0.002
ZnCl ₂	0.005
MnSO ₄	0.02
CoCl ₂	0.005
NiCl ₂	0.0001
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.0005
pH	5.0
Tariq e Irvine, 1995	

Tabla 27. Medio GA

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	10.0
L-asparagina. H ₂ O	1.4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.6
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0004
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.00009
H ₃ BO ₃	0.00007
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00002
FeCl ₃	0.001
ZnCl ₂	0.0035
Cloruro de tiamina	0.0001
Biotina	0.000005
pH	6
Trupkin y col., 2003	

Tabla 28. Medio C-limitado

Componente	[g L ⁻¹]
Glucosa	10.0
Peptona	5.0
Extracto de levadura	1.0
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
B ₄ O ₇ Na ₂ .10H ₂ O	0.0001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00001
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.00005
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.00001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.00007
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.00001

Barrasa y col., 2009

Tabla 29. Medio YGA

Componente	[g L ⁻¹]
Extracto de levadura	33
Glucosa	15
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄ 7H ₂ O	5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
Vitamina B1	0.1
pH	5

Jing Si y col., 2012

Después de 24 h de incubación los cilindros inoculados se situaron sobre el colorante inmovilizado en la mezcla detallada en la tabla 15. Los aceptores de electrones se suministraron en solución cada 24 h (Tabla 30).

Tabla 30. Aceptores de electrones para LiP y MnP

	LiP	MnP
H ₂ O ₂	500 ul para 0.04 %	500 ul para 0.04 %
Alcohol veratrílico	500 ul para 10 mM	- - - -
MnSO ₄ . H ₂ O	- - - -	500 ul para 2 mM

9.6 Expresión del gen *vpl2* de *P. eryngii* en la cepa fúngica seleccionada

9.6.1 Promotores

El promotor *PcbC* de la isopenicilina N-sintetasa de *Penicillium chrysogenum*, se encuentra en el plásmido pULC43 de 4.9 kb (Fig. 6a). El cual contiene también la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *S. cerevisiae* y un gen de resistencia a cloranfenicol.

El promotor constitutivo *PgpdA* de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa *Aspergillus nidulans* contenido en los plásmidos pLJANBar (Fig. 6b) y pDLAM89d (Fig. 6d) de 5771 y 4505 pb, respectivamente. El plásmido pLJANBar contiene además un gen de resistencia contra apramicina en bacterias mientras que pDLAM89d contiene un gen de resistencia contra ampicilina.

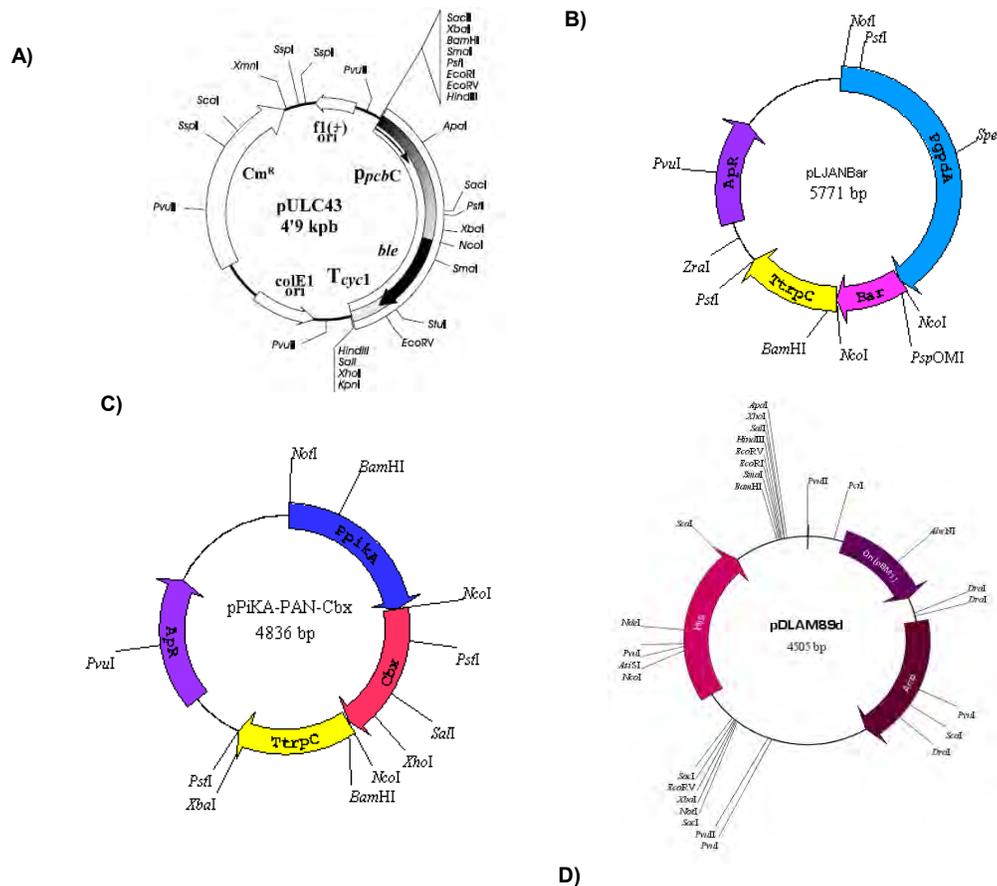


Fig. 6 Vectores de expresión de genes de resistencia bajo promotores constitutivos

El promotor constitutivo *PpikA* de piruvato cinasa de *Aspergillus niger*, se encuentra en el plásmido pPiKA-PAN-Cbx de 4836 pb (Fig.6c) el cual contiene un gen de resistencia en bacterias contra apramicina.

9.6.2 Genes de resistencia contra antifúngicos como marcador de selección de transformantes

Se cuenta con el gen *ble*, el cual tiene su origen en las especies de actinomicetos productores de talisomicina como *Streptoalloteichus hindustanus* que codifican una pequeña proteína (13.7 kDa) que confiere resistencia a talisomicina y antibióticos relacionados; incluyendo bleomicina, fleomicina y zeomicina. Estos glicopeptidos funcionan como antibióticos porque se enlazan y se intercalan en las cadenas de DNA destruyendo la integridad de la doble hélice. El papel de la proteína BLE es evitar las interacciones del DNA con estos antibióticos mediante su secuestro con una fuerte afinidad.

El gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* y el gen *pat* codifican una enzima llamada fosfotricina acetil transferasa (PAT), que detoxifica 4-(hidroxi-(metil)fofinoil)-D,L-homoalanina (L-PPT) también llamado fofoinotricina. El L-PPT es el ingrediente activo del herbicida glufocinato de amonio es cual generalmente se encuentra en proporción equimolar de una mezcla racémica de L-PPT y D-PPT. Sin embargo, solo el L-PPT inhibe a la enzima glutamina sintetasa (GS) la cual que juega un rol esencial en el metabolismo del nitrógeno, ya que la GS cataliza la condensación de glutamato y amonio para formar glutamina. Por lo tanto cuando el L-PPT inhibe a la enzima GS el resultado es la acumulación de amonio en altos niveles.

El gen *cbx* de *Ustilago maydis* confiere resistencia al fungicida sistémico carboxina (Cbx). La carboxina evita la respiración mitocondrial inhibiendo la actividad de succinato deshidrogenasa (sdh) también conocida como succinato ubiquinona reductasa (SUR). La secuencia del gen de resistencia *cbx* (EC1.3.99.1) muestra un alto grado de homología con genes de la subunidad hierro-sulfuro de la succinato deshidrogenasa de otros microorganismos.

El gen de resistencia *hyg* de *Streptomyces hygroscopicus* codifica una cinasa que inactiva la higromicina B a través de fosforilación. La higromicina B es un activo contra células procariontas y eucariontas que actúa inhibiendo la síntesis de polipéptidos. La higromicina B actúa estabilizando el sitio aceptor ribosomal-tRNA, inhibiendo la traslocación.

Para la selección del gen de resistencia se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad a cada antifúngico por las dos cepas seleccionadas *Aspergillus terreus* y *Talaromyces spectabilis* siguiendo el diseño experimental de la tabla

14. El ensayo se llevo a cabo en cajas de petri de 60x15 mm, un total de 0.44×10^8 esporas, en 7 ml de medio Czapeck y mediante el método de cobertera, que consiste en depositar una primera capa de 5 ml de medio donde una vez solidificado se extenderán las esporas. Esta preparación se deja secar bajo condiciones de esterilidad y posteriormente se incuba a 30°C durante 2 h. Finalmente las esporas son cubiertas con 2 ml del mismo medio pero incluyendo la cantidad deseada de antifúngico tomando como volumen final 7 ml.

Tabla 31. Diseño experimental del análisis de sensibilidad de las cepas seleccionadas contra antifúngicos

	[µg/ml]	0	600	800	1000	1250	1500
<i>A. terreus</i>	Carboxina	x x	x x	x x	x x	x x	x x
	Glufocinato	x x	x x	x x	x x	x x	x x
	Fleomicina	x x	x x	x x	x x	x x	x x
<i>T. spectabilis</i>	Carboxina	x x	x x	x x	x x	x x	x x
	Glufocinato	x x	x x	x x	x x	x x	x x
	Fleomicina	x x	x x	x x	x x	x x	x x

9.6.3 Estrategia de construcción del vector de expresión pGvpG

El vector de expresión pGvpG, contiene un casett de expresión para la peroxidasa versátil *vpl2* de *Pleurotus eringii* bajo la regulación de un promotor constitutivo como el promotor de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans*, *PgpdA*, un péptido señal que permita su excreción al medio como el de la TAKA amilasa de *A. oryzae* y una señal de terminación como el de la amilasa B de *A. awamori*. La construcción de este vector se siguió mediante dos estrategias. La estrategia número 1 comprende la amplificación de todos los elementos funcionales a partir del vector pGMGavm para clonar *vpl2* en los extremos (7a). La estrategia número 2 comprende la amplificación por separado del promotor, péptido señal, *vpl2* y terminador, y la subsiguiente clonación en pBluescript KS (7b).

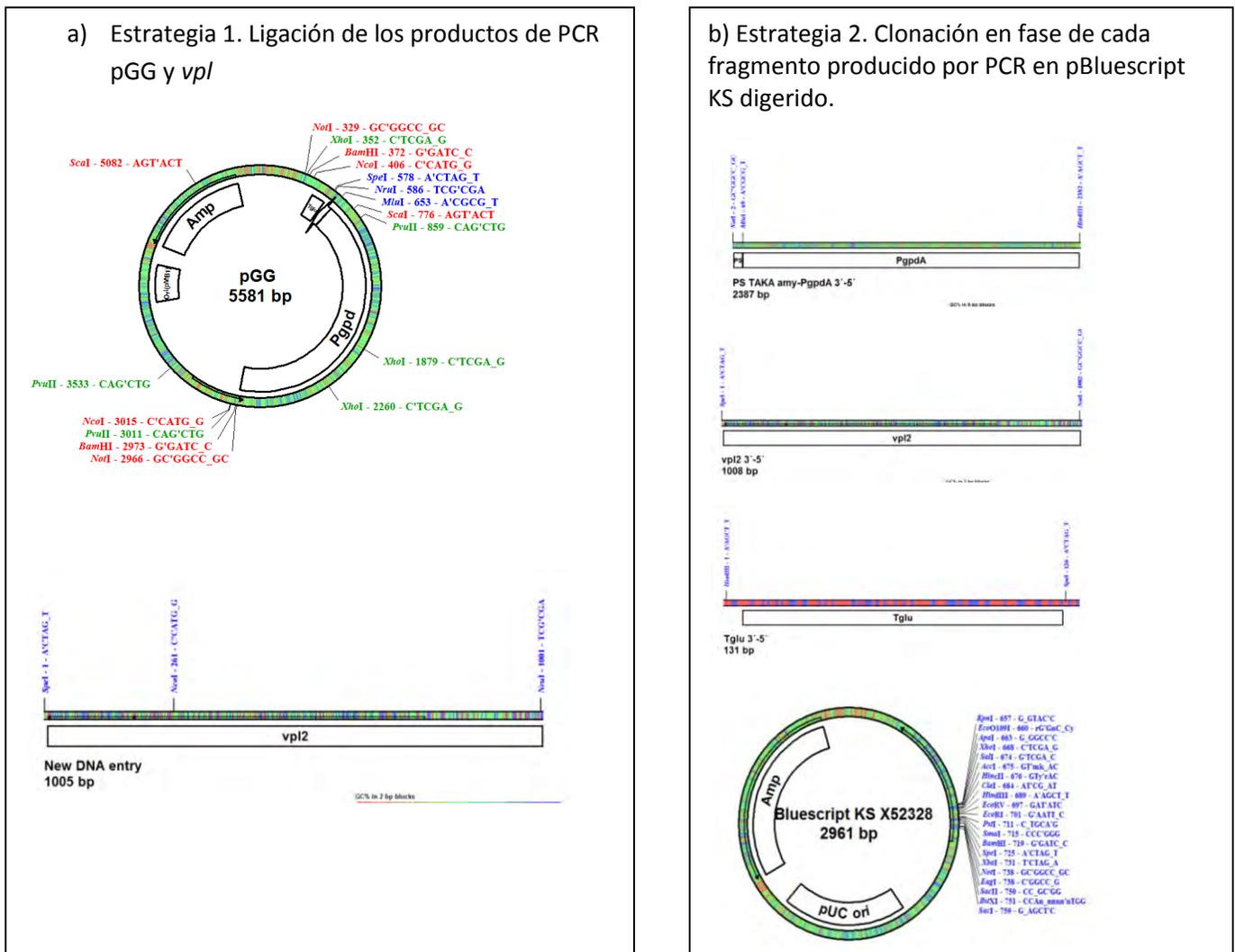


Fig. 7 Estrategias de construcción de pGvpG

Estrategia 1. Construcción de pGvpG a partir de PCR inversa

Tomando como ADN molde el plasmido pGMGavm (Fig. 8) se amplificaron todos los elementos funcionales a excepción del gen que no es de interés.

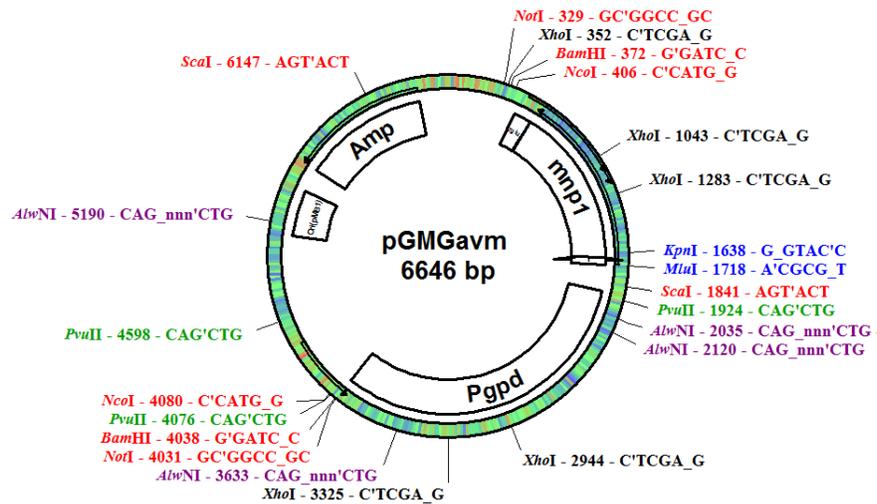


Fig. 8 Vector pGMGavm

El producto de PCR pGG se obtuvo con tres variantes debido a los sitios de restricción en el extremo 3' del péptido señal, ya sea *NdeI*, *NruI* o *SnaBI*; no así en el extremo 5' del terminador, donde siempre se integro un sitio de reconocimiento *SpeI* (Fig. 9).

El fragmento pGG de 5581 bp contiene el promotor de *gpdA*, el péptido señal *amyB* y el terminador *gluA*, además de los mismos elementos de replicación y resistencia que el plasmido pGMGavm y el sitio de clonación *SpeI*-*NruI* ó *NdeI* ó *SnaBI* (Fig. 10).

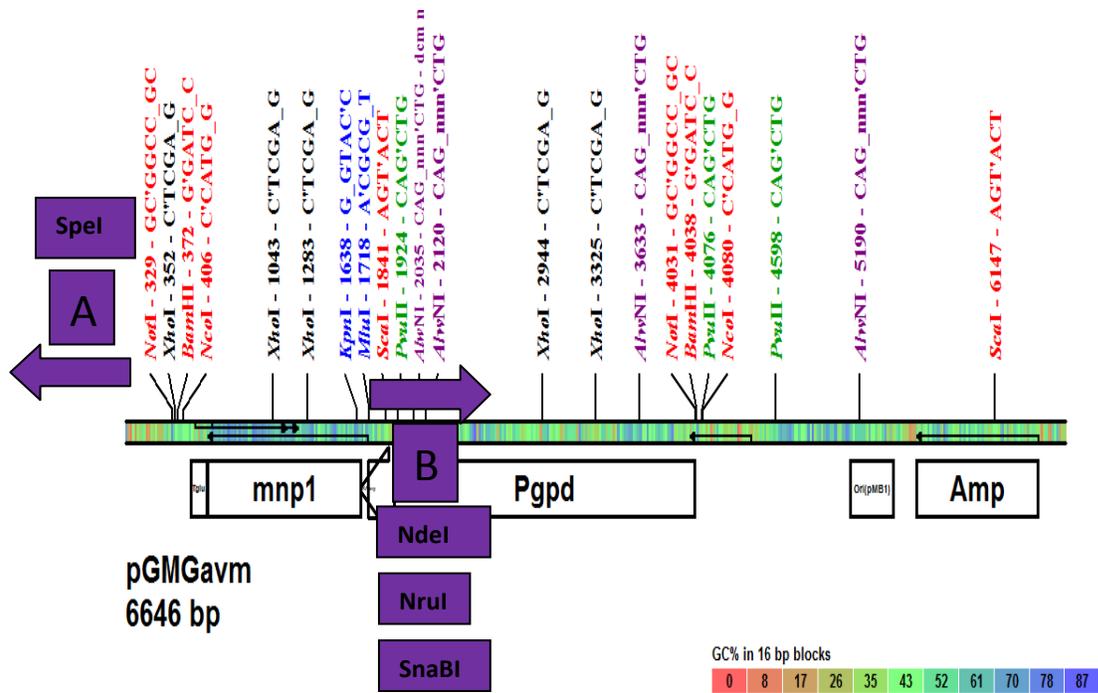


Fig. 9 Amplificación del fragmento pGG

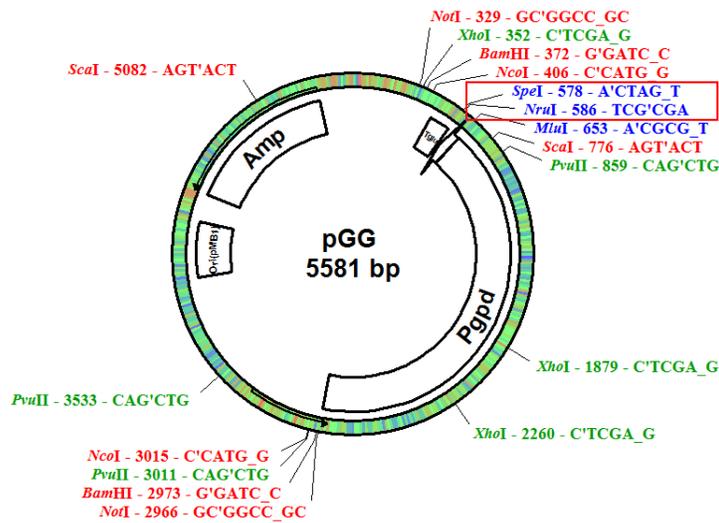


Fig. 10 Producto de PCR pGG

El gen *vp12* (Fig.11) se amplificó a partir de pALMP2 (Fig. 12) insertando los sitios de restricción NdeI y NruI ó NdeI ó SnaBI. Posteriormente los productos de PCR; NdeI -*vp12*- SpeI, NruI-*vp12*-SpeI y SnaBI-*vp12*-SpeI fueron clonados en el vector pSC-A-amp/Kan de Strataclone.



Fig. 11 Producto de PCR cDNA *vp12*

El vector pALMP2, fue donado por el Dr. Ángel Martínez y contiene el promotor inducible de la enzima alcohol deshidrogenasa, el cDNA de una peroxidasa versátil de *Pleurotus eringii*, así como una señal de termino *trpC*.

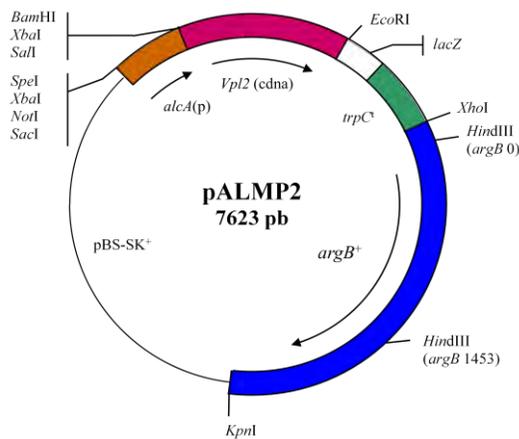


Fig. 12 Vector pALMP2

El producto de PCR *vp12* corresponde a la amplificación del cDNA de la peroxidasa versátil, tiene un tamaño aproximado de 1013 bp y de este producto se obtuvieron 4 variantes con la característica de tener un sitio de reconocimiento en el extremo 5' ya sea para NotI, NdeI, NruI o SnaBI; mientras que en el extremo 3' se inserto

para todos los casos el sitio de reconocimiento para SpeI. Los componentes de la PCR y las condiciones de amplificación para este fragmento se enlistan en la tabla 32.

Tabla 32. PCR del cDNA *vpI2*

Componentes de la PCR		Condiciones de amplificación			
Componente	Volumen	Etapas	T (°C)	T (min)	Ciclos
5X Buffer	10 µl	Desnaturalización	95	3	1
dNTP's [10mM]	1 µl	Desnaturalización	95	0:30	
Cebador <i>vpINotI</i> , <i>vpINdeI</i> , <i>vpINruI</i> o <i>vpISnaBI</i> [0.4 µ/µl]	1 µl	Hibridación	60	0:30	35
Cebador <i>SpeIvpI</i> [0.4 µ/µl]	1 µl	Elongación	72	1	
GoTaq DNApol [5 U/µl]	0.5 µl	Extensión final	72	7	1
pALMP2 [5 ng/µl]	1 µl				
H ₂ O	34.5 µl				

El producto de PCR correspondiente al gen *vpI* de 1005 bp se clonó en el sitio *SpeI*-*NruI* de pGG para producir el plásmido pGvpG (Fig.13).

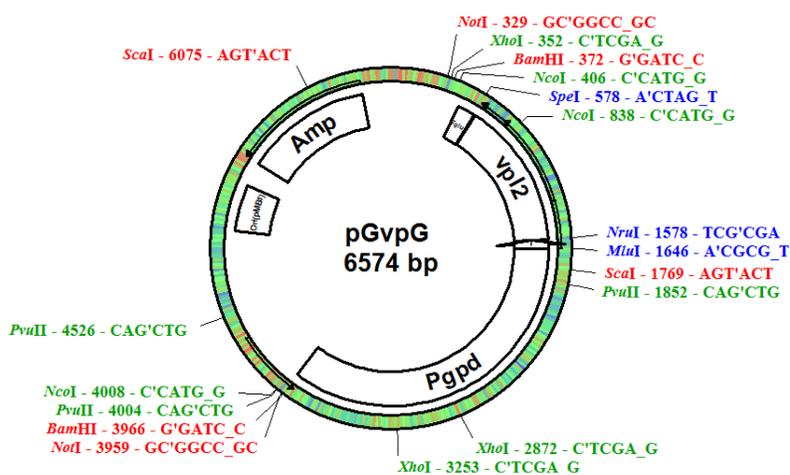


Fig. 13 Vector pGvpG

El diseño de los oligonucleótidos se llevo a cabo manteniendo ciertos lineamientos como el contenido de G+C de 40-60%, un tamaño de 18-25 pb, valores de Tm con una diferencia <5°C. En cuanto a los sitios de restricción se adicionaron tantos nucleótidos como fuera necesario al extremo 5' para asegurar el reconocimiento por la enzima. El número de nucleótidos necesarios alrededor del sitio de restricción es específico para cada enzima y para un mayor acercamiento se consulto el catalogo de New England Biolabs que contiene esta información. Los oligonucleótidos se analizaron mediante el programa Primer Select del paquete DNA star el cual predice la temperatura a la cual se pueden formar dímeros entre los oligonucleótidos o estructuras secundarias. Los oligonucleótidos diseñados para esta estrategia se enlistan en la tabla 33.

Tabla 33. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'	Longitud	%GC	Tm
SpeIvpl	GGACTAGTTTACGATCCAGGGAC	23	52.2	64.6
TgluSpeI	CCCTGCCTAAACTAGTAATCCATTTTCG	27	44.4	64.6
NdeIPS	CCGTCTGGACATATGGCAGCC	21	61.9	66.5
vplNdeI	CAGAAACGCGCCATATGCGAC	21	57.1	64.5
NruIPS	CGGGTACCGTCGCGACAGACT	21	66.7	68.4
vplNruI	GCGCAACTCGCGACGACG	18	72.2	66.7
SnaBIPS	TCTGGACATACGTAAGCCAAAG	22	45.5	60.8
vplSnaBI	GTCCAGAAATACGTAACCTTGC	21	42.9	58.7

Los componentes de la reacción y las condiciones de amplificación para cada variante del producto de PCR pGG se describen a continuación en la tabla 34.

Tabla 34. PCR de pGG

Componentes de la PCR		Condiciones de amplificación			
Componente	Volumen	Etapas	T (°C)	T (min)	Ciclos
5X Buffer	10 µl	Desnaturalización	95	3	1
dNTP's [10mM]	2 µl	Desnaturalización	95	0:30	
Cebador NdeI/PS, o NruI/PS o SnaBI/PS	2 µl	Hibridación	60	0:30	30
Cebador TgluSpeI [0.4 µ/µl]	2 µl	Elongación	72	5	
MgCl ₂ 25mM	2 µl	Extensión final	72	7	1
GoTaq DNApol [5 U/µl]	0.5 µl	Observaciones: La temperatura óptima de hibridación para obtener el producto de PCR pGGSnaBI fue de 58°C.			
pGMGavm [5 ng/µl]	1 µl				
H ₂ O	30.5 µl				

Estrategia 2. Construcción de pGvpG a partir de la clonación de los productos de PCR Pgpda-PS, vpl2, Tglu en pBluescript KS.

PCR gpda-PS. Este producto de PCR es la amplificación del tándem promotor-péptido señal y su tamaño es de 2387 pb. Su amplificación comprende la inserción de un sitio de reconocimiento para NotI en el extremo 3' del péptido señal y el sitio de reconocimiento para SacII e HindIII en el extremo 5' del promotor gpda (Fig. 14). Este producto de PCR fue clonado en el vector pSC-A-amp/Kan de Strataclone.

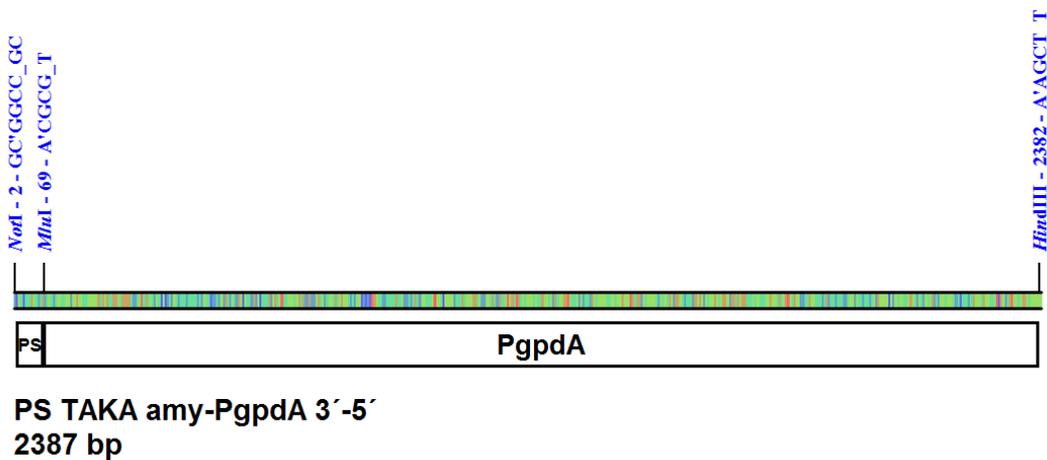


Fig.14 Producto de PCR PS TAKA amy-Pgpda

Los componentes de la PCR y las condiciones de amplificación del fragmento PS TAKA amy-PgpdA se enlistan en la tabla 35.

Tabla 35. PCR del fragmento PS TAKA amy-PgpdA

Componentes de la PCR		Condiciones de amplificación			
Componente	Volumen	Etapa	T (°C)	T (min)	Ciclos
5X Buffer	10 µl	Desnaturalización	95	3	1
dNTP's [10mM]	1 µl	Desnaturalización	95	0:30	
Cebador NotIPS [0.4 µ/µl]	1 µl	Hibridación	66	0:30	35
Cebador PgpdAHindIIISacII	1 µl	Elongación	72	2:30	
GoTaq DNApol [5 U/µl]	0.5 µl	Extensión final	72	7	1
pGMGavm [5 ng/µl]	1 µl				
H ₂ O	34.5 µl				

PCR Tglu. Este producto de PCR corresponde a la amplificación del terminador de la glucoamilasa de *A. awamori*, tiene un tamaño de 131 pb y tiene sitios de reconocimiento para SpeI e HindIII en los extremos 3'-5', respectivamente. Este producto de PCR fue clonado en el vector pSC-A-amp/Kan de Strataclone.

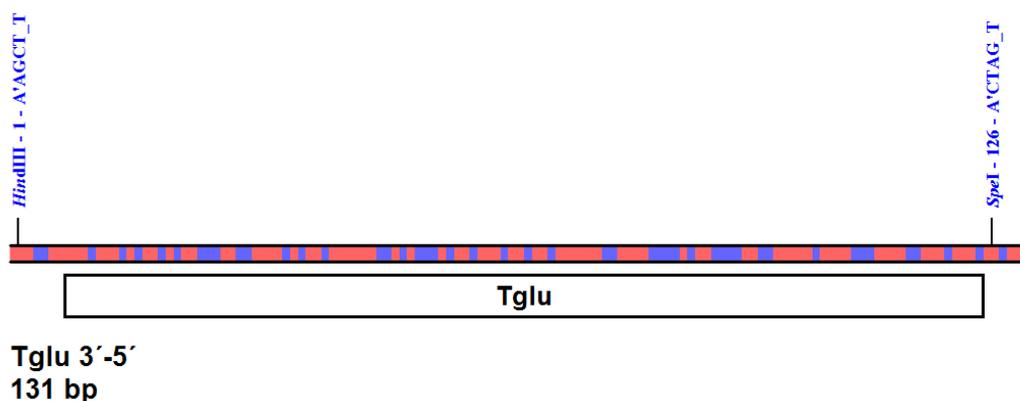


Fig. 15 Producto de PCR Tglu

Las condiciones para la amplificación del terminador se muestran en la tabla 36.

Tabla 36. PCR del fragmento Tglu

Componentes de la PCR		Condiciones de amplificación			
Componente	Volumen	Etapas	T (°C)	T (min)	Ciclos
5X Buffer	10 µl	Desnaturalización	95	3	1
dNTP's [1mM]	1 µl	Desnaturalización	95	0:30	
Cebador TgluSpeI [0.4 µ/µl]	1 µl	Hibridación	58	0:30	35
Cebador EcoRV/EcoRI/Tglu [0.4 µ/µl]	1 µl	Elongación	72	0:20	
GoTaq DNApol [5 U/µl]	0.5 µl	Extensión final	72	7	1
pGMGavm [5 ng/µl]	1 µl				
H ₂ O	34.5 µl				

Los productos de PCR *SacII*/*HindIII*/*Pgp*/*dAPS*/*NotI*, *NotI*/*SpeI*/*SpeI*/*Tglu*/*EcoRI*/*EcoRV* se clonaron en fase en el sitio de clonación múltiple de pBluescript KS en los sitios indicados (Fig 16).

**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)**

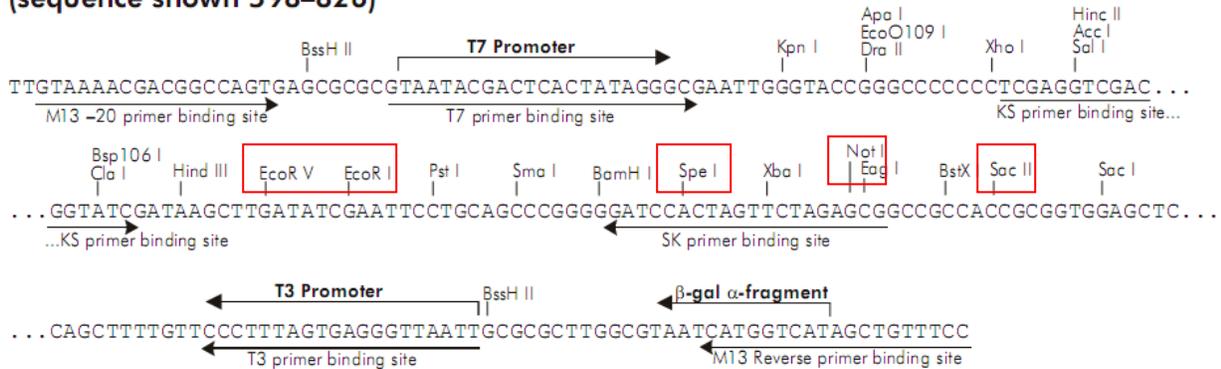


Fig 16. Sitios de interés para la clonación de productos de PCR

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo siguiendo la regla general de que los plásmidos recombinantes circulares monoméricos pueden obtenerse cuando se ponen cantidades equimolares de plásmido y de inserto, con una concentración <10 µg/mL (Bercovich y col., 1992). Si la proporción molar del vector en relación con el inserto es incorrecta, entonces la reacción de ligación puede generar un gran número de plásmidos vacíos o plásmidos con tándem de inserto. La proporción molar del inserto respecto al vector en la reacción de ligación no debería ser menor de 2:1 y no mayor de 4:1

$$\frac{(\text{ng de vector})(\text{kb del inserto})}{\text{Kb del vector}} \quad \frac{(\text{proporción molar de inserto})}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

La clonación del producto de PCR *NotI*/*SpeI* en pBS-KS se hizo a partir de la digestión de ambos DNAs primero con *SpeI* de New England Biolabs, ya que su buffer contiene una concentración mas baja. Posteriormente se digirió con *NotI* de Promega. Las condiciones de digestión se detallan en la tabla 37.

Tabla 37. Reacciones de digestión del fragmento *vp/2* y el vector pBS-KS con las enzimas *SpeI* y *NotI*

Componente	Volumen	Componente	Volumen
NeBuffer2	1 µl	Buffer D	2 µl
pBS-KS [30 ng/µl]	0.5 µl	pBS-KS [15 ng]	10 µl
PCR <i>NotI</i> / <i>SpeI</i> [50 ng/µl]	0.5 µl	PCR <i>NotI</i> / <i>SpeI</i> [25 ng]	
<i>SpeI</i> [10U/ µl]	0.5 µl	<i>NotI</i>	0.5 µl
H ₂ O	7.5 µl	H ₂ O	7.5 µl
Digestión 37°C x 4hr Inactivación 80°C x 20 min		Digestión 37°C x 2hr Inactivación 65°C x 15 min	

Las reacciones de ligación se siguieron como lo recomienda el fabricante de la ligasa empleada, que para este caso fue T4 DNA ligasa de la marca Roche Cat. No. 10716359001 500U (1U/ μ l) (Tabla 38).

Tabla 38. Condiciones de las reacciones de ligación

Componentes	Extremos protuberantes	Extremos romos
DNA templado	$\leq 1 \mu\text{g}$ de DNA digerido	$\leq 1 \mu\text{g}$ de DNA digerido
Buffer de ligación 10X	3 μ l	3 μ l
T4 DNA ligasa	1-5 U	1-5 U
H ₂ O	Ajustar a 30 μ l	Ajustar a 30 μ l
Incubación	4-16°C, por una noche	16-25°C, por una noche

Una vez inactivada la última enzima de restricción usada, la mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de ligación (Tabla 39).

Tabla 39. Reacción de ligación del fragmento *vpl2* en el vector pBS-KS

Componente	Volumen
DNA pBS-KS 15 ng	20 μ l
DNA <i>vpl</i> 25 ng	
10X Buffer	3 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l
H ₂ O	6 μ l

4-16°C x 1 noche

9.6.4 Métodos de transformación de hongos

Actualmente se cuenta con diversos métodos de transformación de hongos. Entre ellos, los métodos basados en la generación de protoplastos, los métodos mediados por *Agrobacterium*, la biobalística y la electroporación.

El método de transformación por protoplastos una eficiencia muy baja de transformación en comparación con los demás métodos. En contraste, la eficiencia tan alta que presenta la transformación mediada por *Agrobacterium* es muy atractiva; sin embargo, el casset de expresión del gen de interés debe ser construido en un vector binario que primero tiene que ser insertado en *Agrobacterium* antes de transformar al hongo en cuestión. Tan solo el cocultivo de la cepa transformada de *Agrobacterium* con la cepa fúngica nativa requiere 48 h (Jin y col., 2008). Por esto se ha recurrido con mayor frecuencia a métodos de transformación menos tardados y con eficiencia de transformación aceptable.

Electroporación

Se sabe que la aplicación de pulsos de un campo eléctrico fuerte a células y tejidos causa algún tipo de re-arreglo estructural de la membrana celular. La hipótesis inicial fue que algunos de estos re-arreglos consistían en la formación de vías acuosas temporales llamadas poros. Sin embargo en la visión actual, el campo eléctrico juega el rol dual: causar la formación del poro y además proveer una fuerza motriz local para el transporte iónico y molecular a través de los poros (Kapoor M. 1995).

En el caso de las células puede ocurrir un intercambio molecular relativamente no específico entre los volúmenes intra- y extracelular, y puede conducir a desequilibrios químicos. Dependiendo de la relación del volumen, la composición de medio extracelular, y el tipo de célula, la célula puede no recuperarse del estrés asociado y morir (Weaver, 1995).

Las esporas fúngicas han sido empleadas exitosamente como células competentes en la transformación por electroporación de muchos hongos filamentosos (Sánchez Aguirre, 1996). Sin embargo las esporas germinadas han mostrado ser más competentes para recibir DNA foráneo antes de la división nuclear y la formación de septos (Robinson y Sharon 1999; Koukaki y col., 2003). Es por esto que se siguieron cinéticas de germinación de esporas de *A. terreus* y *T. spectabilis* en cultivo sumergido siguiendo el diseño experimental de la tabla 40.

Tabla 40. Diseño experimental de germinación de esporas en cultivo sumergido

Cepa fúngica	Medio YPG
<i>A. terreus</i>	X
<i>T. spectabilis</i>	X

Las esporas fueron inoculadas en matraces de 500 ml con 100 ml de medio YPG a una concentración final de 1×10^7 esp ml⁻¹. La incubación se mantuvo a 30 °C y 150 rpm. Una alícuota de cada matraz se obtenía cada hora y se observó en microscopio óptico para determinar el tiempo de aparición del tubo germinal.

Los protocolos propuestos en la literatura revisada (Sánchez y Aguirre, 1996; Kapoor M. 1995) para la preparación de esporas se usaron para *T. spectabilis* y se describen a continuación.

Protocolo de electroporación para *Talaromyces spectabilis* utilizando enzimas líticas (Kapoor M., 1995)

1. Colectar conidios en agua estéril con 0.1% de tween 80. Las esporas deben ser frescas para asegurar una máxima eficiencia de transformación. Inocular 100 mL de medio YPG con 1×10^7 esporas/ml.
2. Crecer el cultivo a 30°C con agitación a 150 rpm por 6 h para *T. spectabilis* y 9 h para *A. terreus*.
3. Adicionar preparación multienzimática (1mg/ml) inmediatamente después de que los tubos germinales hayan aparecido, y continuar la incubación mientras se agita con las mismas condiciones de crecimiento por un tiempo adicional de 2 h.
4. Centrifugar la suspensión de esporas germinadas a 5900g en tubos estériles por 10 min.
5. Remover cuidadosamente el sobrenadante que contiene la enzima usando una pipeta Pasteur estéril, resuspender las esporas germinadas en el buffer de electroporación (HEPES 1mM, pH 7.5, manitol 50 mM), y centrifugar a 5900g por 10 min. Repetir el paso de lavado por tres veces mediante centrifugación y resuspensión del pelet conidial.
6. Resuspender el pelet en 0.5-1 ml de buffer de electroporación. La suspensión resultante se guardó en alícuotas de 50 µl a -80°C y se usaron como células competentes para transformación por electroporación.

7. A 100 μ L de suspensión de esporas, adicionar 1-2 μ g de DNA (en 1 o 2 μ L). Enfriar la mezcla sobre hielo por 15 min, y someter a electroporación a temperatura ambiente. Controles, sin DNA adicionado, son tratados de la misma forma.
8. Pulsar una vez con un campo de fuerza de 12.5 kV/cm; capacitancia, 25 μ F; resistencia, 400 Ω . Esto dará lugar a un tiempo constante de alrededor 5 ms.
9. Inmediatamente después de la electroporación, adicionar 1 mL de YED (1 % extracto de levadura, 1% glucosa, HEPES 20 mM, ajustar a pH8) en la cubeta de electroporación, resuspender rápidamente el contenido, transferir la mezcla a un tubo estéril, e incubar de 2-3 h a 30°C, mientras se agita. Este paso es importante para la recuperación óptima de transformantes. La recuperación óptima debería ser determinada empíricamente para cada cepa/especie.
10. Finalmente, las transformantes son seleccionadas por extensión superficial en placas de petri con diluciones apropiadas de la suspensión de spora en un medio de selección conveniente que contenga 1.5% de agar. La selección del medio dependerá del plásmido/gen empleado en la transformación.
11. Después de que la superficie se haya secado, cubrir las placas con agar blando (0.7 % de agar + medio líquido que contenga el antifúngico), e incubar las placas.
12. Las colonias fungicas aparecen dentro de las 48-72 h en placas con el antifúngico correspondiente. Transferir las colonias individuales a placas con el medio de selección. Ninguna colonia se debería observar en los controles electroporados en ausencia del plásmido y plaqueadas en medio con antifúngico. La eficiencia de transformación está estimada en la base del número de recuperación de colonias resistentes/ μ g de DNA.

Protocolo de electroporación para *Talaromyces spectabilis* con DTT (Meyer y col., 2003)

1. Colectar conidios en agua estéril con 0.1% de tween 80. Las esporas deben ser frescas para asegurar una máxima eficiencia de transformación. Inocular 100 mL de medio YPG con 1×10^7 esporas/ml.
2. Crecer el cultivo a 30°C con agitación a 150 rpm por 6 h para *T. spectabilis* y 9 h para *A. terreus*.
3. Centrifugar la suspensión de esporas germinadas a 5900g en tubos estériles por 10 min.
4. Resuspender las esporas germinadas en 200 ml de agua estéril para lavarlas, centrifugar 5 min a 4000 x g y 4°C. Realizar este lavado 2 veces más.

5. Segunda resuspensión en 25 mL de YED pH 8.0 más 12.5 mM DTT e incubar 60 min, 30°C y 100 rpm.
6. Centrifugar 5 min a 4000 x g.
7. Resuspender el pelet en 0.5-1 ml de EB (Tris HCl 10 mM pH 7.5, sacarosa 270 mM, Ac. de litio 1 mM) a una concentración de 10^9 conidia/ml y mantener en hielo Posteriormente, 500 μ l de glicerol esteril se adiciono dentro del tubo y La suspensión resultante se guardo en alícuotas de 50 μ l a -80°C y se usaron como células competentes para transformación por electroporación.
8. A 50-100 μ L de suspensión de esporas, adicionar 1-2 μ g de DNA (en 1 o 2 μ L). Enfriar la mezcla sobre hielo por 15 min, y someter a electroporacion a temperatura ambiente. Controles, sin DNA adicionado, son tratados de la misma forma.
9. Pulsar una vez con un campo de fuerza de 12.5 kV/cm; capacitancia 25 μ F; resistencia 400 Ω . Esto dará lugar a un tiempo constante de alrededor 5 ms.
10. Inmediatamente después de la electroporación, adicionar 1 ml de YED frío en la cubeta de electroporación, resuspender rápidamente el contenido, transferir la mezcla a un tubo estéril, e incubar de 2-3 h a 30°C, mientras se agita. Este paso es importante para la recuperación óptima de transformantes. La recuperación óptima debería ser determinada empíricamente para cada cepa/especie.
11. Finalmente, las transformantes son seleccionadas por plaqueo con diluciones apropiadas de la suspensión de spora en un medio de selección conveniente que contenga 1.5% de agar. La selección del medio dependerá del plásmido/gen empleado en la transformación.
12. Después de que la superficie se haya secado, cubrir las placas con de agar blando (0.7 % de agar + medio líquido que contenga el antifúngico), e incubar las placas.
13. Las colonias fúngicas aparecen dentro de las 48-72 h en placas con el antifúngico correspondiente. Transferir las colonias individuales a placas con el medio de selección. Ninguna colonia se debería observar en los controles electroporados en ausencia del plásmido y plaqueadas en medio con antifúngico. La eficiencia de transformación está estimada en la base del número de recuperación de colonias resistentes/ μ g de DNA.

La tabla 41 muestra el diseño experimental sugerido para la transformación de *A. terreus* y *T. spectabilis* por el método de electroporación. Tomando como controles esporas electroporadas en cultivo sin antifungico, para

asegurar la viabilidad de las células. Así mismo este control sirve para comprobar la permanencia del fenotipo nativo. El segundo control consta de esporas electroporadas sin plásmido pero cultivadas con antifúngico para evidenciar que la resistencia es conferida por la inserción del caset de expresión.

Tabla 41. Diseño experimental de transformación por electroporación

Cepa fúngica	Plásmido	Electroesporas
<i>A. terreus</i>	pPiKA-BAR-Cbx	DTT
		Enz
	pLJANBar	DTT
		Enz
<i>T. spectabilis</i>	pPiKA-BAR-Cbx	DTT
		Enz
	pLJANBar	DTT
		Enz

Biobalística

La biobalística es un método de transformación que emplea microportadores revestidos de DNA para introducirlos en las células. De esta forma, el bombardeo con microproyectiles puede transformar bacterias, hongos, insectos, plantas y células animales.

El instrumento de biobalística PDS-1000/He usa helio presurizado para acelerar microproyectiles revestidos con DNA (u otro material biológico) sobre un rango de velocidades necesarias para transformar óptimamente diferentes tipos de células.

Aunque se sabe que la conveniencia de este método se debe a que con él es posible transformar células intactas en cultivo, ya que se requiere una mínima manipulación antes o después del bombardeo, también se siguieron cinéticas de germinación de esporas de los hongos seleccionados pero en cultivo superficial con el diseño experimental de la tabla 42.

Tabla 42. Diseño experimental de germinación de esporas en cultivo superficial

Cepa fúngica	Medio Czapeck
<i>A. terreus</i>	X
<i>T. spectabilis</i>	X

Las esporas (1×10^8 esporas) fueron extendidas en cajas petri de 90x15 mm. Se incubaron a 30°C y se muestreo cada hora para observar en microscopio óptico.

Los protocolos de transformación por biobalística fueron ligeramente modificados para adaptarlos a *Aspergillus terreus* como a *Talaromyces spectabilis* y se describen a continuación.

Transformación por biobalística de *Aspergillus terreus* (Adaptado de Herzog y col., 1996).

1. Los conidios de *A. terreus* (1×10^8) germinados o intactos se extendieron en 10 ml de medio Czapeck.
2. Estas placas se usaron para el bombardeo. Cada placa fue bombardeada 2 veces con partículas de tungsteno 0.7 μm impulsadas por helio 5.5-8.3 MPa (800-1200 lb/in²).
3. La distancia del disparo fue de 6 cm, el vacío de la cámara fue de 94.7 kPa, 28 Hg
4. Las esporas se dejaron recuperar por 2 h.
5. Se adiciono 15 ml del mismo medio con la cantidad deseada de antifúngico para un volumen final de 25 ml.
6. Una vez solidificadas, las placas se incubaron a 30°C y solo las esporas transformantes emergieron del medio.

Tabla 43. Diseño experimental de transformación de *A. terreus* por biobalística

Cepa fungica	Plasmido	No. Disparos	Antifungico	Unidades Experimentales
<i>A. Terreus</i>	pPiKA-BAR-Cbx	1	Carboxina 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	x
Control resistencia	-----	1		x
<i>A. Terreus</i>	pLJANBar	1	Glufocinato 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	x
Control resistencia	-----	1		x
Control viabilidad	-----	1	-----	x

Transformación por Biobalística de *Talaromyces spectabilis* (Adaptada de Chavez-Barreto 1997)

1. Para el método de biobalística, los conidios intactos fueron usados. 5-30 μl de una suspensión de esporas (10^9 ml^{-1}) fueron situadas en el centro de una caja Petri para el bombardeo.
2. Inmediatamente después del bombardeo, la suspensión de conidios fueron transferidos a 5 ml de Czapeck líquido e incubado a 28 °C por 18 h.

3. Los conidios fueron colectados por centrifugación y resuspendidos en 2 ml de YMG.
4. Alicuotas de 200 μ l fueron plaqueadas en el medio selectivo y re-incubadas a 28 °C.
5. De acuerdo a la referencia con este método se obtuvieron 33-153 colonias μ g⁻¹ DNA.
6. Cuando los conidios fueron subcultivados en medio no selectivo, no se perdió la resistencia después de 5 transferencias sucesivas, y los transformantes mostraron un crecimiento normal, morfología colonias y producción de las esporas.

La explicación principal y obvia de los autores sobre la eficiencia de transformación tan alta del método de biobalística puede ser que el plásmido es inyectado directamente en el núcleo, sin la exposición del DNA exógeno a nucleasa citoplasmicas (Chavez-Barreto y col., 1997).

Tabla 44. Diseño experimental de transformación de *T. spectabilis* por biobalística

Cepa fungica	Plasmido	No. Disparos	Antifungico	Unidades Experimentales
<i>T. spectabilis</i>	pPiKA-BAR-Cbx	1	Carboxina 1000 μ g ml ⁻¹	x
Control resistencia	-----	1		x
<i>T. spectabilis</i>	pLJANBar	2	Glufocinato 1000 μ g ml ⁻¹	x
	pLJANBar	1		x
Control resistencia	-----	1		x
Control viabilidad	-----	1	-----	x

Los experimentos de transformación se llevaron a cabo para estandarizar las condiciones de transformación y para asegurar que el gen de resistencia a carboxina no interfiera con la función metabólica de la célula. El uso de un gen de resistencia como el glufosinato tiene la ventaja de que, en contraste a los marcadores de selección como el benomilo o el metabolismo de acetamida, no interfiere con otras funciones celulares o metabólicas de las células transformantes (Chávez Barreto y col., 1997). Otro de los objetivos fue comprobar que efectivamente los promotores PpKiA de *A. niger* y PgdA de *A. nidulans* sean reconocidos por la maquinaria transcripcional de *A. terreus* y *T. spectabilis*.

10.Resultados y discusión

10.1 Aislamiento de cepas fúngicas

El muestreo se llevo a cabo en la Coatzacoalcos, Veracruz. En las coordenadas 18° 09' latitud norte y 94° 26' longitud oeste, a una altura de 10 metros sobre el nivel del mar.



Fig.7 Suelo muestreado

El clima de la zona es cálido-regular con una temperatura promedio de 25.6 °C. La flora en el lugar de muestreo fue principalmente de pastizales y el suelo está conformado por minerales como el azufre, arena sílice y su característica principal es que presenta acumulación de arcilla en el subsuelo cuyo pH es ácido, su color es rojo o amarillo calroy y es susceptible a la erosión (Fig. 7). La zona está caracterizada por contar con yacimientos de petróleo y gas natural.

En general el sureste de México es una zona rica en petróleo. Se ha calculado que cada pozo petrolero puede afectar 1000 m² de suelo en una profundidad de hasta 2 m. El suelo contaminado puede presentar niveles de hidrocarburos alrededor de 100 000 mg de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) kg⁻¹ de materia seca (Rivera-Cruz y col., 2002). Ante este escenario, el aislamiento de cepas fúngicas de suelos contaminados con hidrocarburos se ha propuesto ya que estas cepas no presentarían inhibición cuando fueran aplicadas en sistemas de biorremediación de suelos altamente contaminados con PAHs.

Las colonias que emergieron, tras el aislamiento, a la superficie contaminada con petróleo fueron pequeñas y aisladas (Fig. 8) Estas fueron traspasadas a medios con PDA y EMA por inoculación por estría para asegurar un completo aislamiento.



Fig.8 Colonias fúngicas aisladas

En total, se logró aislar 37 cepas fúngicas por su capacidad de crecer en presencia de petróleo crudo. Las características morfológicas de las cepas incluyendo sus conidióforos fueron comparados con especies relacionadas actualmente reportadas para proceder a identificarlas.

10.2 Identificación de los aislados

El análisis y comparación de las ITS de los aislados fúngicos y la morfología sugirieron rotundamente que los aislados pertenecían a los géneros *Aspergillus* (65 %), *Penicillium* (8 %), *Fusarium* (3 %), *Scedosporium* (5%), *Talaromyces* (8%), *Neurospora* (3 %) and *Neosartorya* (8%), cuya frecuencia se muestra como porcentaje. Las características de la morfología colonial y morfología microscópica de por lo menos un representante de cada especie se describe a continuación y puede ser corroborada con la micrografía correspondiente (Fig. 9).

Las cepas de *Aspergillus terreus* muestran colonias color café a cinamon en la mayoría de los medios, mientras que el reverso va de amarillo pálido a café. Las hifas son hialinas y septadas. La longitud de los conidióforos va de 70-300 μm y son de apariencia globosa en su mayoría, las vesículas contienen métulos que soportan las filides. El tamaño de los conidio va de 2-2.5 μm de diámetro, tienen una apariencia lisa, y se desallorran en columnas largas (Fig. 9 C1, C2A, C2B, C3, C4A, C4B, C4C, C6, C8, C13, C15, C16, C27, C28, C29, C30).

La textura de las colonias de *Aspergillus niger* generalmente va de acolchonada a polvosa, la superficie inicialmente es blanca cuando el crecimiento es micelial pero se vuelve negro cuando comienza la producción de las esporas. Mientras que el reverso es de un amarillo pálido o sin color. Las hifas son septadas, hialinas y los metulos soportan las filides productoras de conidios. Los conidióforos alcanzan longitudes que van desde 400-3000 μm y los conidios son de aproximadamente 4-5 μm (Fig. 9 C4D).

Aspergillus fumigatus produce colonias con textura de lana o algodonosa hasta granular. La superficie es de color gris humo a verde y el reverso es amarillo. Los conidióforos son con frecuencia teñidos en gris, y alcanzan

hasta 300 μm de longitud. Las hifas son septadas, hialinas y los conidios son redondos a sub-globosos, lisos o finamente rugosos y con un diámetro de 2-3.5 μm (Fig.9 C9, C14, C18, C25, C26, C31, C32).

Las cepas de *Penicillium chrysogenum* en colonia son de aspecto aterciopelado y de color verde. Típicamente los conidióforos peniciliados son hialinos con metulos con muchos estados de ramificación. Las fialides tienen frecuentemente forma de botella y consisten de una parte cilíndrica en la base y diferentes cuellos. Los conidios son globosos, elipsoidales o cilíndricos, son hialinos o verdes, de pared ya sea lisa o rugosa (Fig. 9 C10A, C7 y C24).

Las cepas de *Fusarium verticillioides* producen colonias lanudas o algodonosas y planas. El color puede ser crema, salmón o rosado. Posee hifas hialinas septadas, solitarias o producidas como un sistema complejo de ramificación. Los macroconidios (8-3x11-70 μm) son producidos a partir de fialides que tienden a acumularse en bolas. Los microconidios varían en tamaño de 2-4x4-8 μm (Fig. 9 C5).

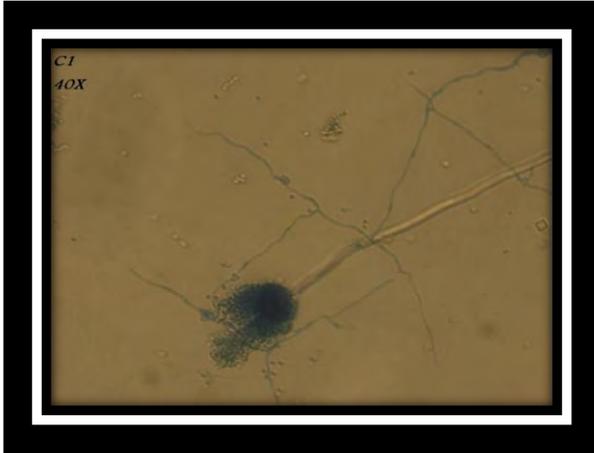
Scedosporium apiospermum posee una superficie algodonosa cuyo color es ligeramente gris a negro, el reverso de la colonia también puede ser gris o negro. Posee estructuras llamadas anélidos que se pueden formar directamente de las hifas septadas hialinas o se pueden formar en la punta de los conidióforos, con la base hinchada y cuello alargado, los conidios son de forma ovalada, de color olivo a marrón, con una base truncada y ligeramente angosta, con un tamaño de 5-2x3-13 μm y aparecen en las puntas de los anélidos (Fig.8 C17, C19)

Talaromyces spectabilis tiene una apariencia plana, usualmente coloreada uniformemente en café o café olivo, con el reverso pálido. Los penicilios nacen de las hifas aéreas. Las fialides se encuentran en grupo o solas, con metulos, y ocasionalmente ramificadas con 12-20 μm de longitud, disminuyendo gradualmente. La mayoría de los conidios son subesferoidales a elipsoidales usualmente de 3-5 μm de longitud con una pared aparentemente lisa (Fig. 9 C10B, C12, C22).

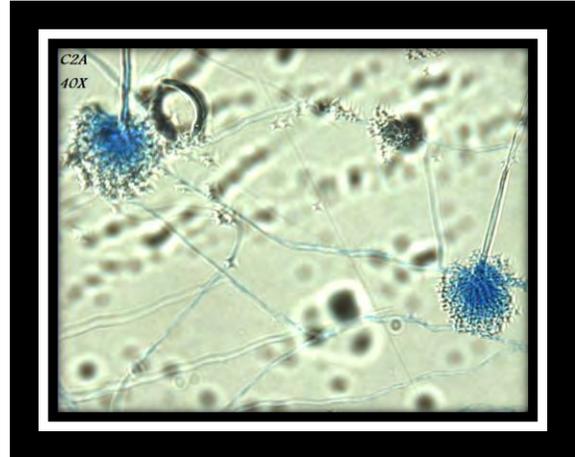
Neurospora crassa crece como una biomasa blanca en el centro consistente de micelio filamentosos suelto y disperso que se colorea a naranja en la periferia. El nombre del género, "nervios-esporas" se refiere a las características de las esporas (Fig.9 C21).

Neosartorya hiratsukae produce colonias aterciopeladas y blancas. El reverso sin color. Hifas hialinas. Los estados de los conidios son morfológicamente muy similares a la de *A. fumigatus* (Fig. 9 C11, C20, C23).

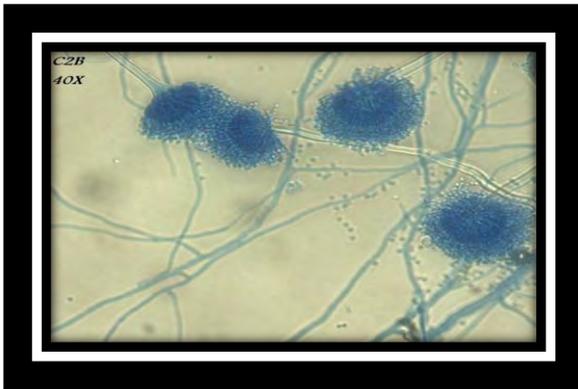
C1



C2A



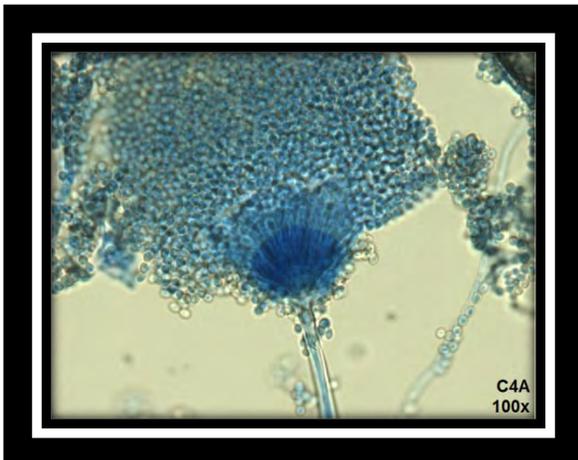
C2B



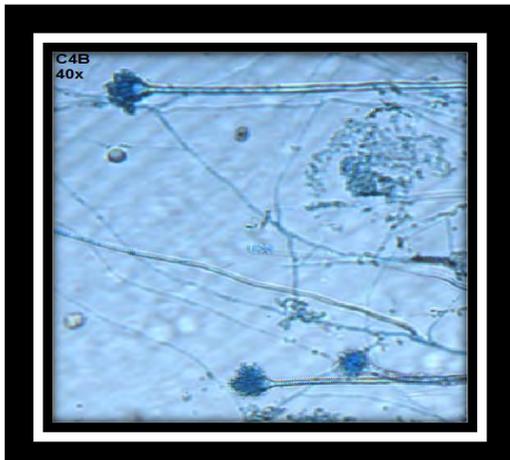
C3



C4A

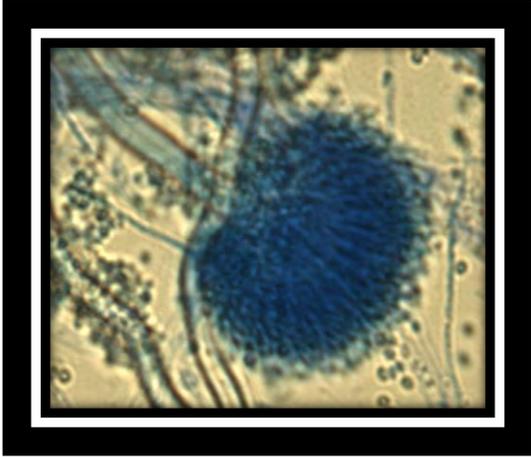


C4B

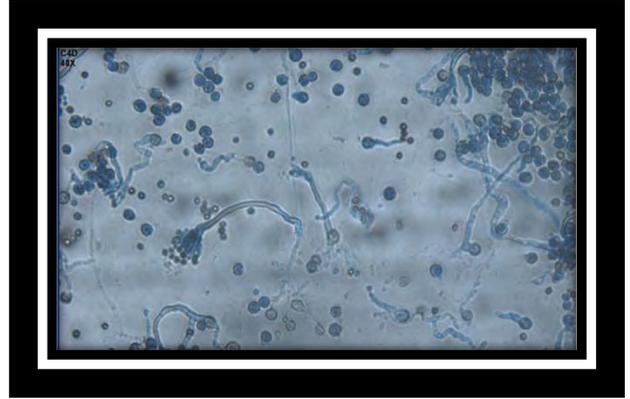


C4C

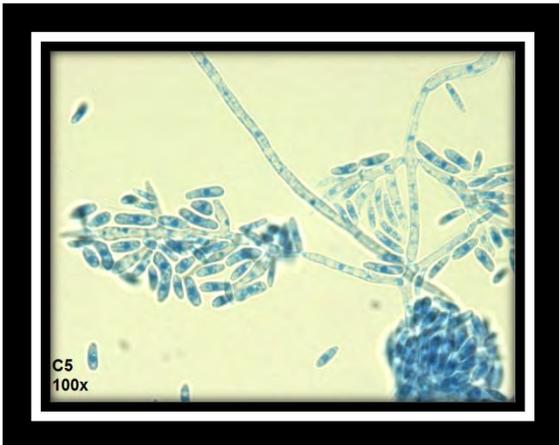
C4D



C5



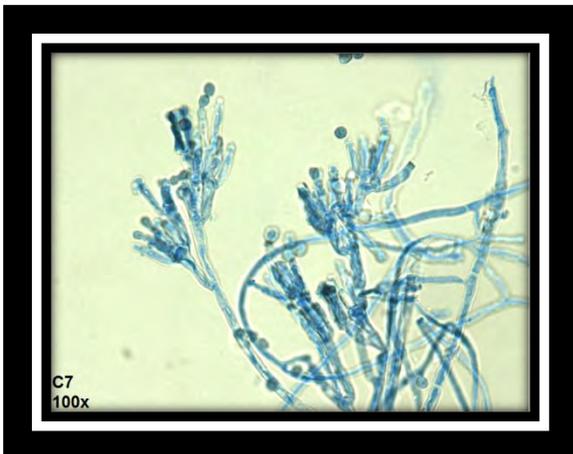
C6



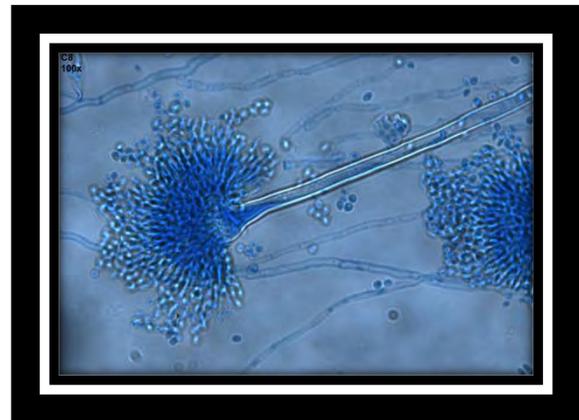
C7



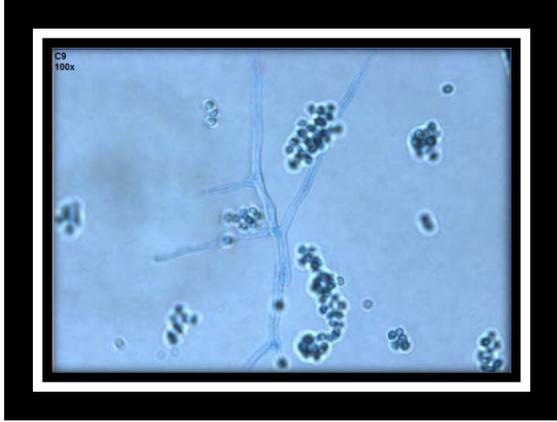
C8



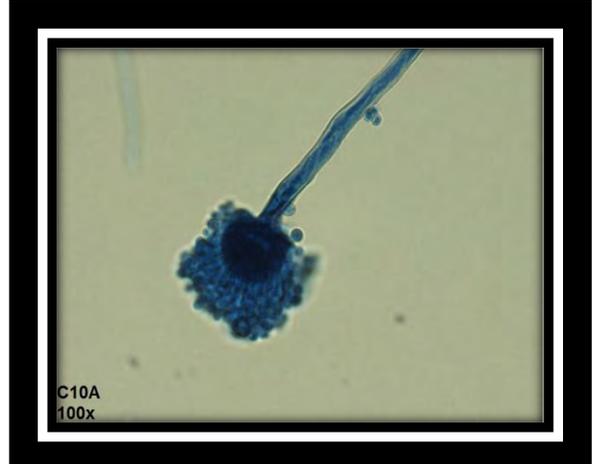
C9



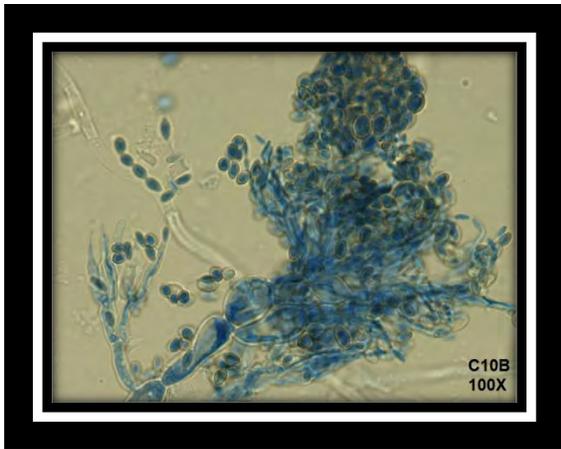
C10A



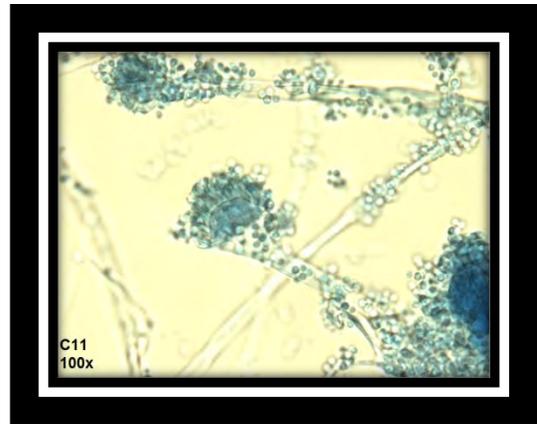
C10B



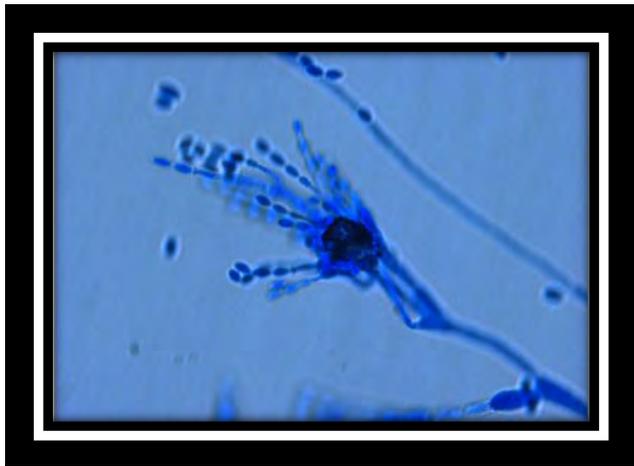
C11



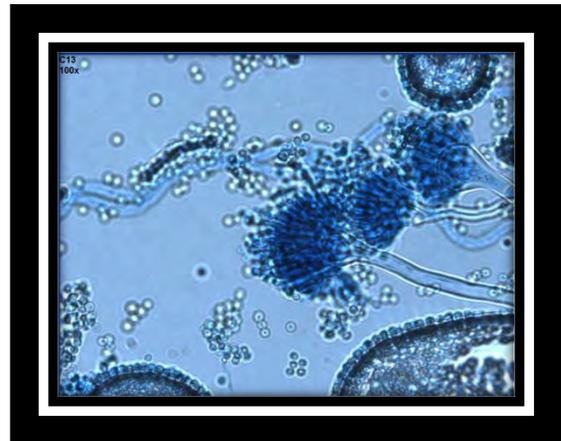
C12



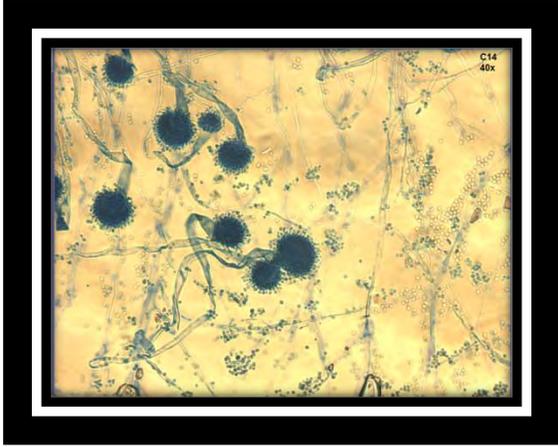
C13



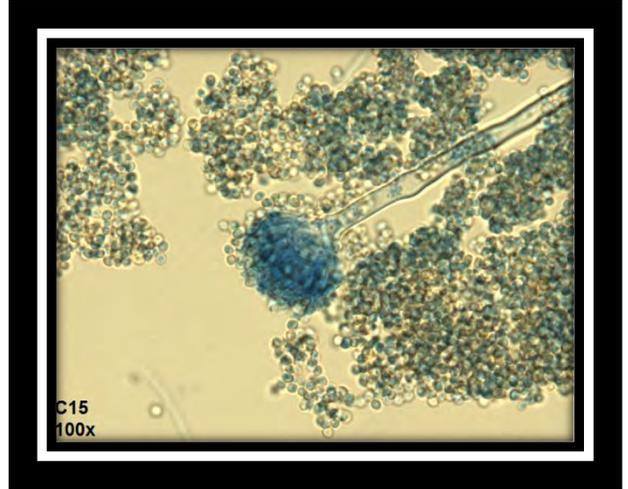
C14



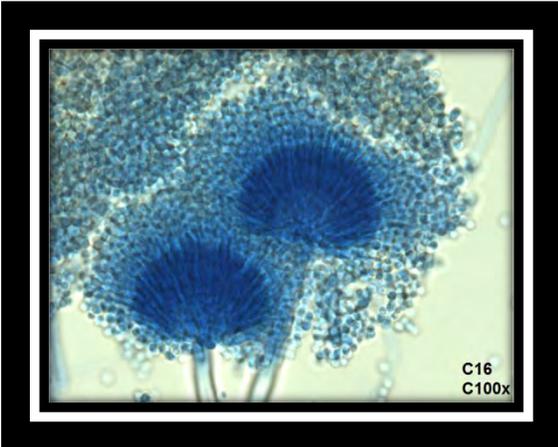
C15



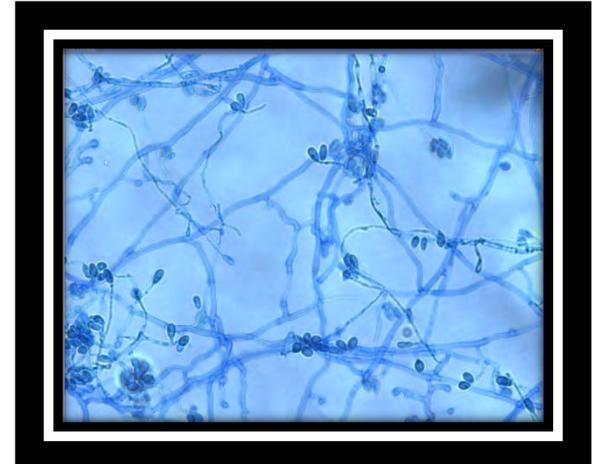
C16



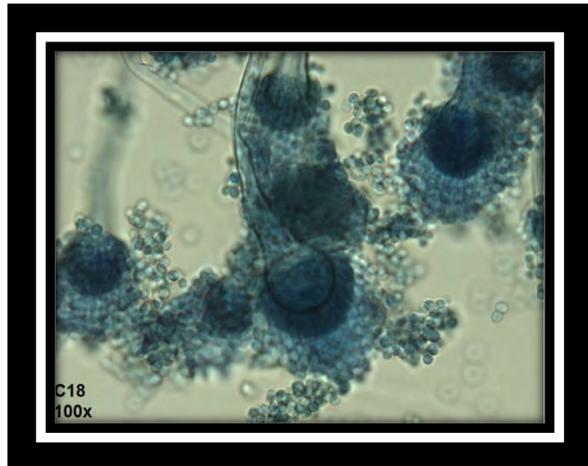
C17



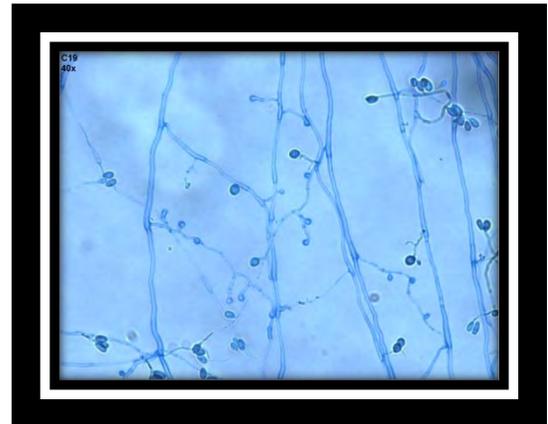
C18



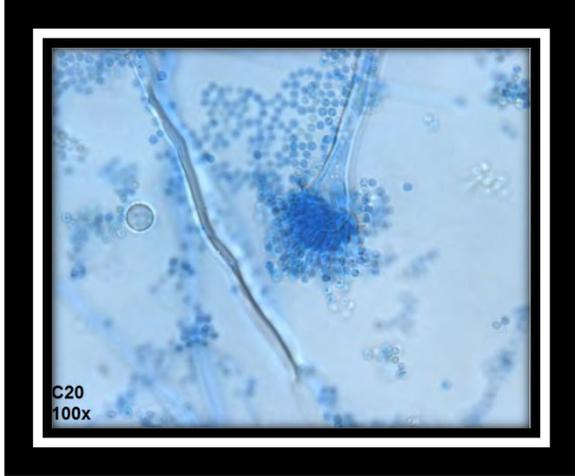
C19



C20



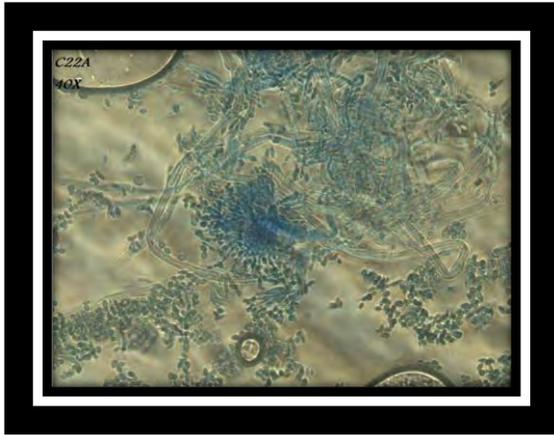
C21



C22



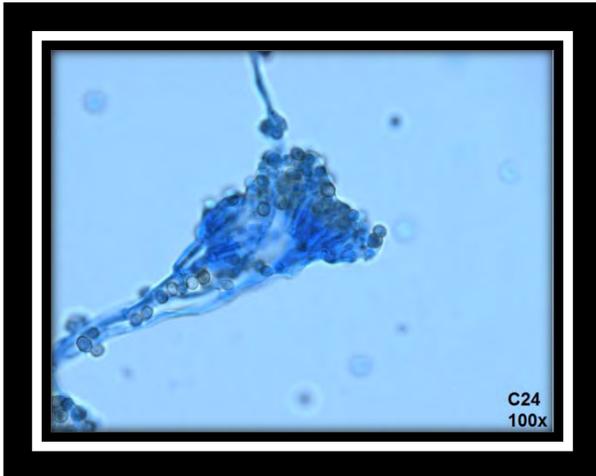
C23



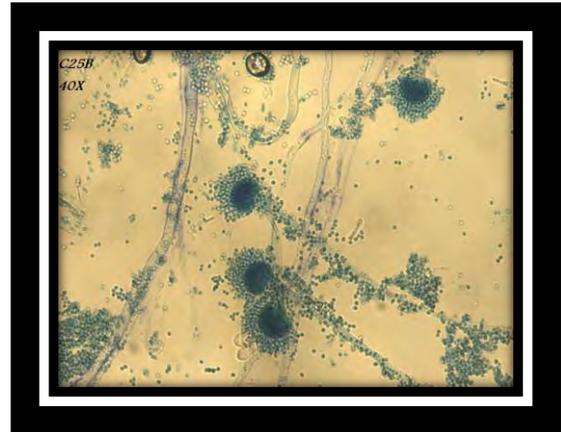
C24



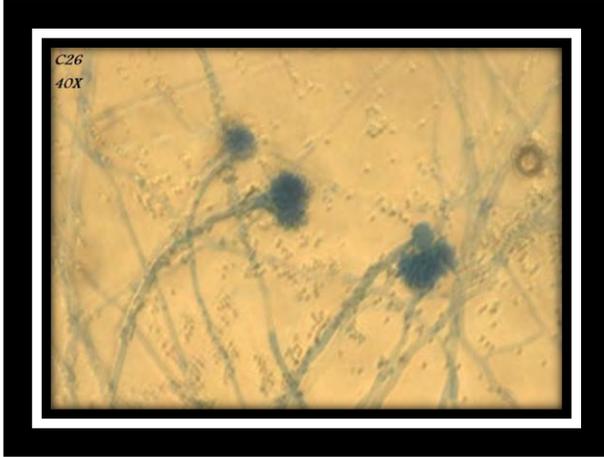
C25



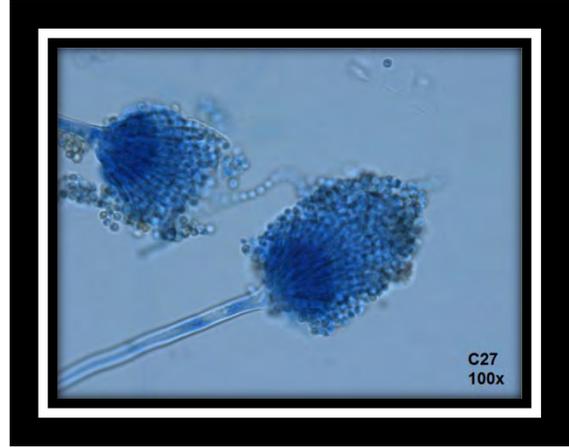
C26



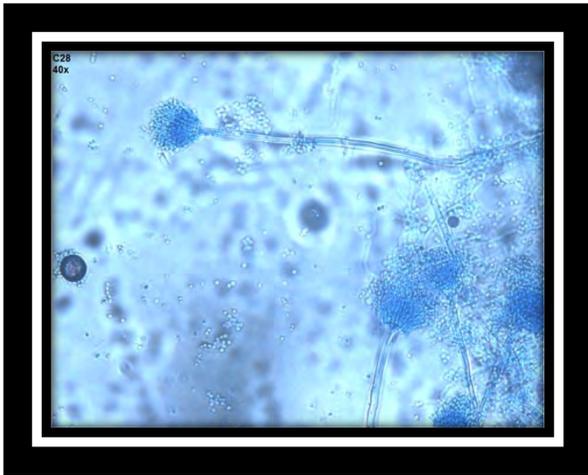
C27



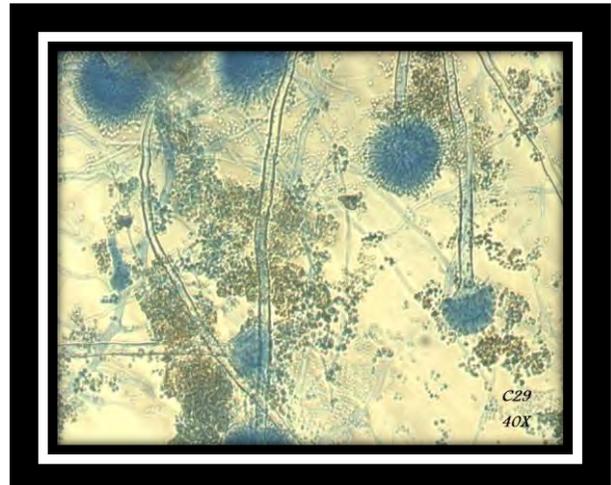
C26



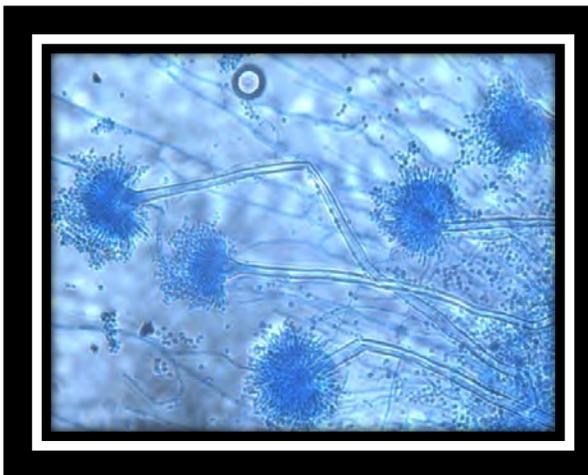
C27



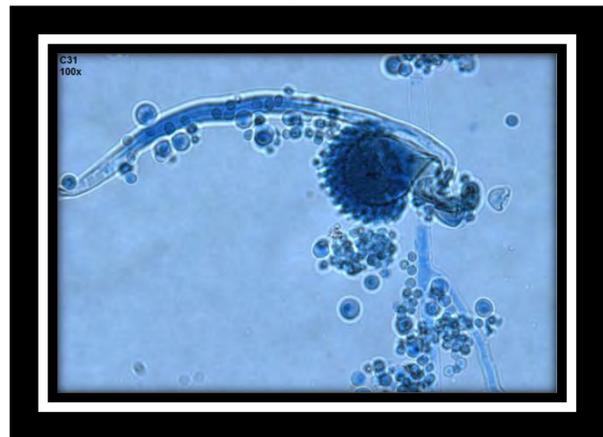
C28



C29



30



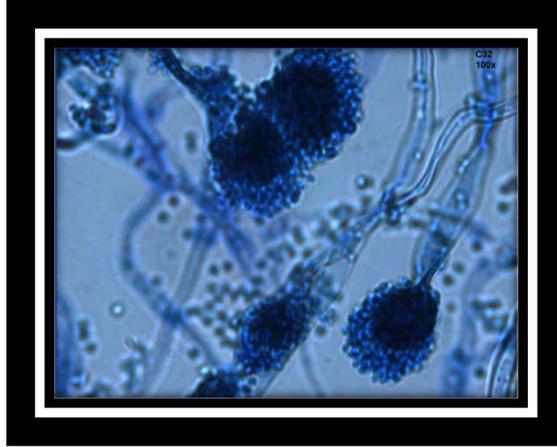


Fig 9. Micrografías de cepas fúngicas aisladas

Para determinar el género y la especie de las cepas fúngicas aisladas fue necesario recurrir a técnicas más precisas como lo son las de biología molecular. Específicamente en este trabajo se utilizó el análisis de las secuencias ITS para lo cual se hizo necesario realizar la extracción de ADN total de hongos cuya concentración se verificó por espectrofotometría, por otra parte la calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

Una vez purificado el ADN se utilizó en PCR, el cual se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el apartado 5.2.2 de material y métodos. Los productos se obtuvieron de un tamaño al reportado por la bibliografía el cual es de 700-800 pb y que fue corroborado también mediante electroforesis (Fig. 10).

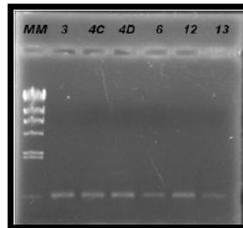


Fig. 10 Productos de PCR de secuencias ITS

Los productos de PCR fueron secuenciados y se compararon con la base de datos de NCBI. Las secuencias se alinearon y se construyeron los árboles filogenéticos así como matrices de identidad en el paquete DNASTar. Todas las especies pertenecientes al género *Aspergillus* se agruparon en un solo árbol filogenético y en una sola matriz de identidad. La colección de cepas aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos comprende 13 cepas de *A. terreus* que aunque pertenecen al mismo género y especie su posición en el árbol filogenético nos dice que hay, aunque pequeña, variación en sus secuencias ITS (Fig. 11). Por ejemplo, la cepa C1 tiene un porcentaje de identidad de 45 % con *A. niger* porque ambos pertenecen al mismo género. Sin embargo, C1 tiene un porcentaje de identidad del 100% con una cepa de *A. terreus* WM03.218 (Fig. 12)

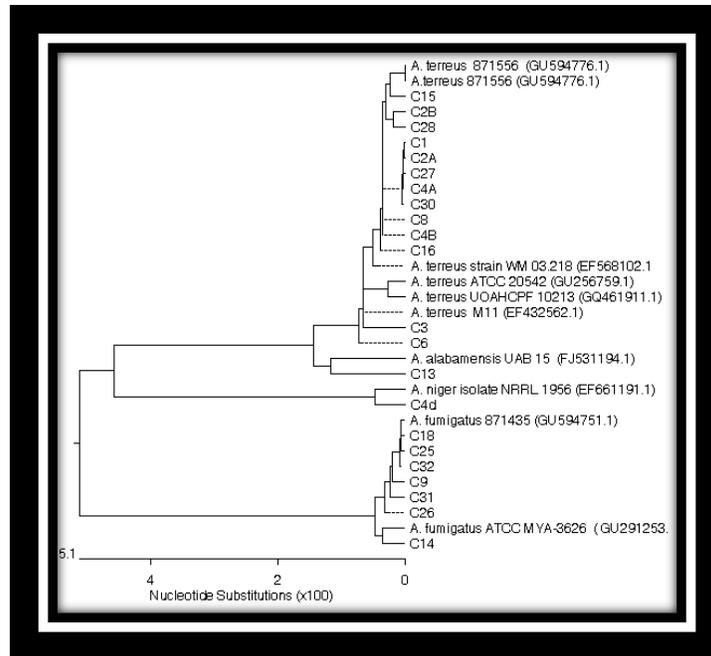


Fig. 11 Árbol filogenético del genero *Aspergillus*

Las cepas aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos diferentes al género *Aspergillus* se agruparon en otro árbol filogenético (Fig. 13) en el que se aprecian 2 cepas de *Neosartoria hiratsukae*, 3 cepas de *Penicillium dipodomycicola*, 3 cepas de *Paecilomyces variotii* también llamada *Talaromyces spectabilis*, 2 cepas de *Scedosporium apiospermum*, una cepa de *Fusarium proliferatum* y una cepa de *Neurospora crassa*.

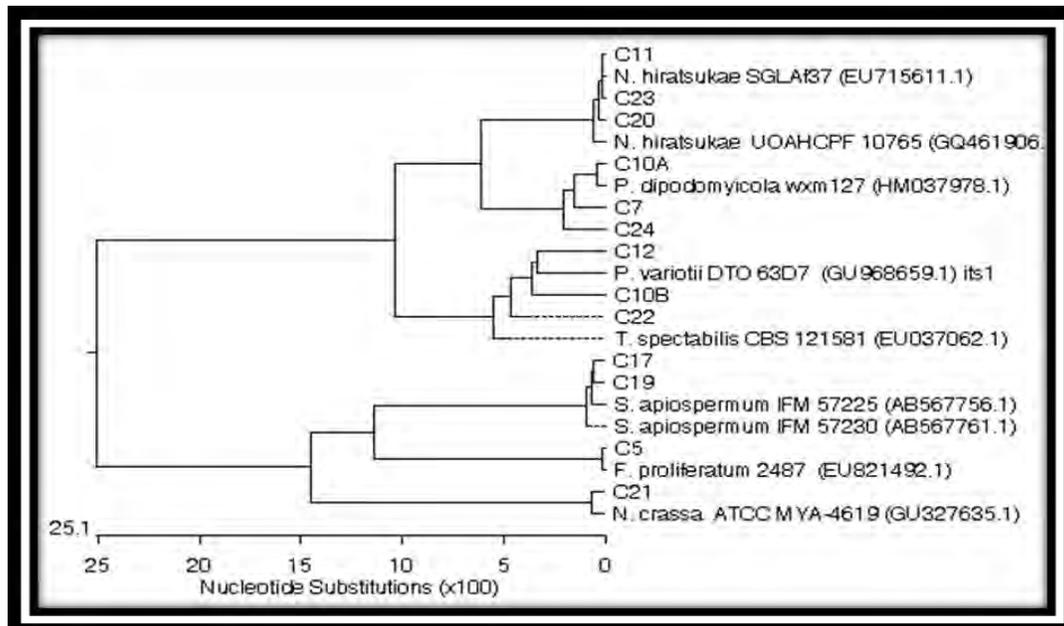


Fig. 13 Árbol filigenético de los género *Neosartoria*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Scedosporium*, *Fusarium* y *Neurospora*

Percent Identity																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	100	56.9	59.6	59.8	62.2	63.4	79.7	76.5	64.6	71.8	59.2	64.4	58.1	64.6	59.8	13.9	80.5	80.7	62.6	99.8	76.5	64.6	1
2	50.0	100	99.8	83.4	87.9	86.7	60.5	57.9	89.2	61.4	86.5	89.0	98.0	89.2	99.8	28.2	60.5	60.3	86.1	55.8	61.3	89.2	2
3	51.6	0.0	100	80.5	84.5	83.6	58.9	56.0	87.1	59.5	82.9	86.9	93.6	87.1	100.0	26.5	59.7	59.5	83.1	55.2	60.4	87.1	3
4	47.8	14.2	17.0	100	85.0	100.0	59.9	59.3	85.0	58.2	96.5	84.8	78.2	85.0	81.0	33.6	59.9	59.9	99.8	55.5	61.6	85.0	4
5	47.5	10.0	13.0	13.0	100	86.0	61.2	59.2	99.8	59.0	82.0	99.6	80.9	99.8	83.5	26.5	61.0	61.0	86.6	57.0	63.0	99.8	5
6	46.9	13.9	17.2	0.0	13.2	100	60.1	57.8	84.7	58.2	96.2	84.5	77.6	84.7	80.2	32.5	60.1	60.1	98.1	56.1	61.7	84.7	6
7	22.6	48.7	51.6	48.1	47.6	48.0	100	95.3	60.6	63.9	55.8	60.4	54.1	60.7	56.0	13.6	99.8	99.1	59.5	70.5	68.1	60.7	7
8	23.1	50.0	53.5	48.3	48.4	47.8	0.5	100	58.9	62.7	55.5	58.9	53.0	58.9	55.0	13.9	98.6	98.9	59.1	69.2	66.1	58.9	8
9	45.8	9.6	12.4	13.0	0.2	13.6	46.4	48.2	100	59.2	80.6	99.5	81.0	100.0	83.6	25.7	62.0	62.0	84.5	58.1	63.9	100.0	9
10	27.6	45.6	45.9	45.5	44.7	45.1	31.2	32.7	43.4	100	63.3	64.5	61.2	64.5	62.0	17.7	70.6	70.4	62.6	69.8	99.6	64.5	10
11	49.4	14.1	15.7	0.0	13.4	0.4	49.9	50.3	13.6	44.8	100	84.3	81.2	84.5	83.0	33.9	59.0	59.0	98.5	54.8	60.7	84.5	11
12	46.0	9.6	12.5	13.0	0.2	13.6	46.3	48.0	0.0	43.1	13.7	100	81.1	99.8	83.7	25.6	61.8	61.8	84.5	57.8	63.8	99.8	12
13	48.0	0.0	0.0	13.0	9.4	13.3	47.5	49.3	8.9	44.0	13.1	8.9	100	90.4	99.8	28.3	61.7	61.5	85.9	57.4	62.9	90.4	13
14	45.8	9.6	12.4	13.0	0.2	13.6	46.3	48.2	0.0	43.4	13.6	0.0	8.9	100	41.5	12.7	32.3	32.3	42.6	30.5	33.0	51.1	14
15	52.2	0.0	0.0	17.6	13.6	17.7	52.2	54.1	13.4	45.9	15.7	13.2	0.0	14.0	100	25.9	58.9	58.7	81.1	54.6	59.6	85.8	15
16	86.3	19.0	19.0	0.0	21.3	0.0	81.5	82.5	21.3	75.9	0.0	21.4	19.0	21.3	19.0	100	42.4	41.8	100.0	37.5	50.0	79.3	16
17	22.2	48.7	51.0	48.1	48.0	48.0	0.2	0.4	46.2	31.0	49.9	46.3	46.9	48.1	52.8	81.5	100	99.4	55.1	72.1	64.9	64.3	17
18	21.9	48.8	51.2	47.9	47.5	47.8	0.5	0.0	45.8	31.1	49.7	45.8	47.1	47.6	53.0	82.5	0.3	100	55.3	72.5	65.0	64.5	18
19	46.7	13.7	16.5	0.0	12.7	0.4	46.9	48.0	12.4	44.8	0.0	12.5	12.5	12.4	17.1	0.0	45.5	45.3	100	57.5	63.1	86.0	19
20	0.2	50.5	51.9	48.3	47.6	47.8	22.7	23.3	45.7	27.6	49.9	46.1	48.3	47.6	53.8	89.0	21.6	21.4	45.1	100	71.5	65.9	20
21	25.7	46.0	47.3	43.5	42.6	43.6	29.8	31.6	41.1	0.4	45.2	41.1	44.1	39.8	49.1	75.9	28.2	28.2	41.3	24.2	100	66.8	21
22	45.8	9.6	12.4	13.0	0.2	13.6	46.3	48.2	0.0	43.4	13.6	0.0	8.9	3.0	14.0	21.3	40.4	40.0	12.2	42.5	39.5	100	22

Fig. 14. Matriz de identidad de los géneros *Neosartoria*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Scedosporium*, *Fusarium* y *Neurospora*

La matriz de identidad (Fig. 14) nos muestra que el porcentaje de divergencia entre C22 y C10B es de cero por lo que puede tratarse de la misma cepa. Las cepas aisladas de *Scedosporium apiospermum* tienen diferencias en el rango de 0.3-0.5 % en sus secuencias ITS. La cepa C11 tiene un porcentaje de identidad de 99.8 tanto con *Neosartoria hiratsukae* SGLAF3 mientras que la cepa C20 tiene un 100% de identidad con *Neosartoria hiratsukae* UOAHCPF.

Es notable, que de las 37 cepas aisladas el 38 % pertenece la especie *Aspergillus terreus* (Fig. 15), mientras que el 19 % lo ocupan especies de *Aspergillus fumigatus*. El 43 % restante de las cepas aisladas lo comprenden cepas de *Aspergillus niger*, *Talaromyces spectabilis*, *Fusarium proliferatum*, *Neosartoria hiratsukae*, *Scedosporium apiospermum*, *Neurospora crassa* y *Penicillium dipodomyicola*.

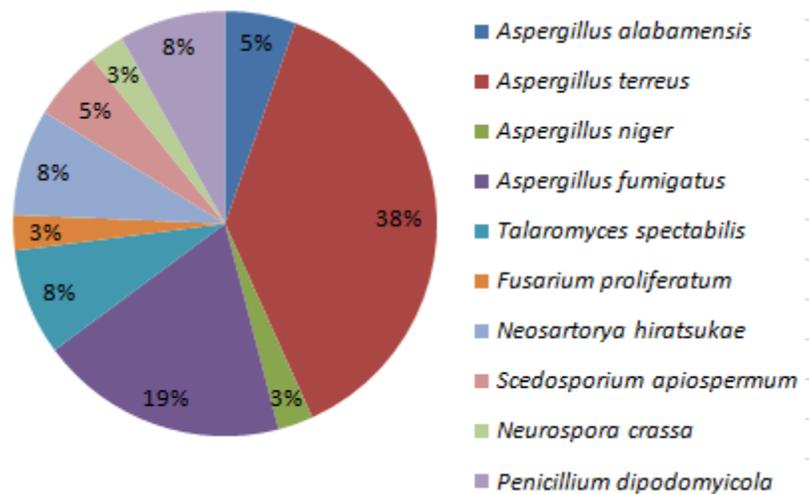


Fig 15. Frecuencia de los generos aislados

El cultivo superficial impregnado con petróleo crudo resulto ser un método de aislamiento muy selectivo ya que solo pequeñas y contadas colonias emergieron. Entre ellas el genero *Aspergillus* el cual tiene la habilidad de crecer en altas temperaturas y actividad de agua baja. Las especies de *Aspergillus* dominan las poblaciones en el trópico de la misma forma que *Penicillium* lo hace en zonas templadas. Esta es la razón de que el mayor número de aislados pertenezcan al género *Aspergillus* mientras que el género *Penicillium* mostró una baja incidencia.

Aunque el género *Talaromyces* tambien es característico de climas cálidos solo tres cepas de este género fueron aisladas. Estos tres ascomicetos con anamorfos en el género *Penicillium*, *Aspergillus*, y *Paecilomyces* han sido clasificados en la familia Trichocomaceae (Pitt y col., 2000). En la literatura reportada se ha encontrado que *P.*

variotii es el anamorfo de *Talaromyces spectabilis*. Debido a que los anamorfos *Paecilomyces* se agrupan dentro de *Byssochlamys*, se ha propuesto una nueva combinación *Byssochlamys spectabilis* (Houbraken y col., 2008; Udagawa and Suzuki, 1994; R.A Samson, np).

En cuanto al género *fusarium* se sabe que incluye especies que son altamente competitivas en contra de hongos patógenos, los cuales pueden contribuir a la mayor captación de nutrientes por la planta (Dix and Webster, 1995) y algunos de ellos producen promotores de crecimiento de plantas jugando así un papel de hongos micorrísicos arbusculares (Fracchia y col., 2000). Sin embargo el árbol filogenético muestra que *F. verticillioides* SCO5A aislado de un suelo contaminado con hidrocarburos se sitúa en un grupo mas cercano a hongos saprofiticos como *F. oxysporum*.

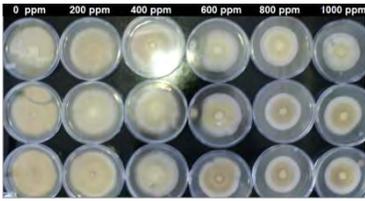
Por otro lado, el género *Scedosporium* es un hongo oportunístico aunque, los humanos inmunocompetentes podrían también ser blanco de sus infecciones (Bernstein et al. 1995). Los géneros antes mencionados así como los géneros *Neurospora* y *Neosartorya* ya han sido aislados de suelos contaminados con hidrocarburos (Naranjo et al., 2007).

10.3 Selección primaria de los aislados

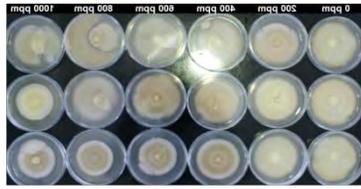
Las cepas fúngicas aisladas, 37 en total, fueron evaluadas por su habilidad de tolerar desde 200 hasta 1000 ppm de una mezcla de PAHs en cultivo superficial. Estas cepas se sometieron a una selección en base a su velocidad de crecimiento radial (Vcr) en la presencia de Phe y Py. El impacto del aumento en la concentración de PAHs sobre cada cepa fue observado en el cambio o conservación de las características de crecimiento colonial como la esporulación, el color de la colonia y la densidad miceliar (Fig. 16).

Se observó que *A. terreus* HCS2B (Fig 16. C2B) y *T. spectabilis* HCS12 (Fig 16. C12) no fueron afectadas en la esporulación, el color de la colonia no cambio y la densidad miceliar sobre la placa no fue reducida, mientras que la densidad miceliar de *F. verticillioides* HCS5A (Fig 16. C5A) disminuyo visiblemente y el color de la colonia de *S. apiospermum* SCO17 (Fig 16. C17) cambio ligeramente de blanco a gris con el aumento en la concentración de PAHs. Un caso notable es el de *A. niger* SCO4D (Fig 16. C4D) el cual no solo disminuyo su Vcr del micelio vegetativo, sino que tambien ceso la capacidad de esporulacion por la falta de micelio aereo. En otros casos, como en *N. crassa* SCO21 (Fig 16. C21) la invasion se inhibio completamente aun en la presencia de bajas concentraciones de PAHs.

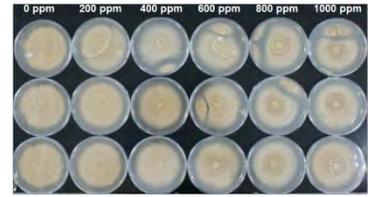
C1



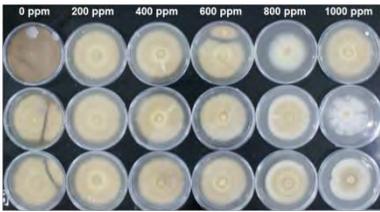
C2A



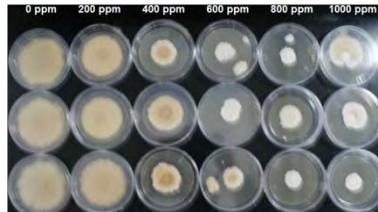
C2B



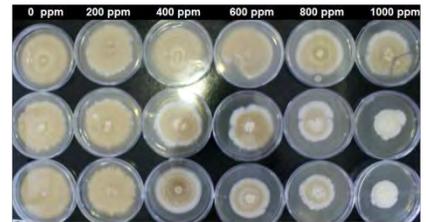
C3



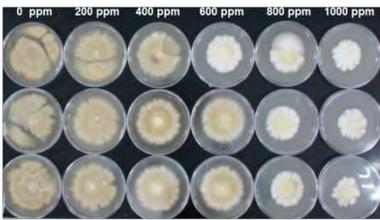
C4A



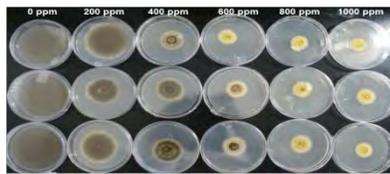
C4B



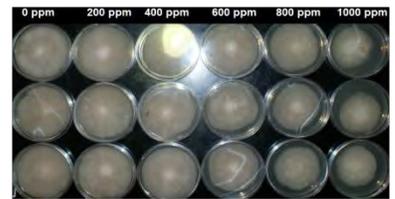
C4C



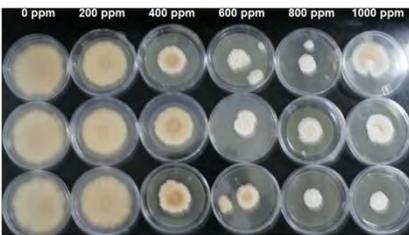
C4D



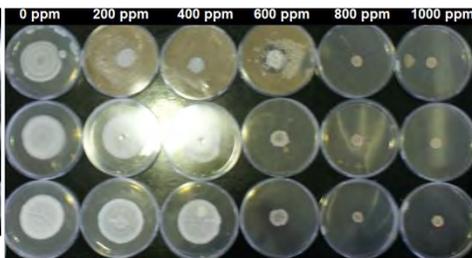
C5



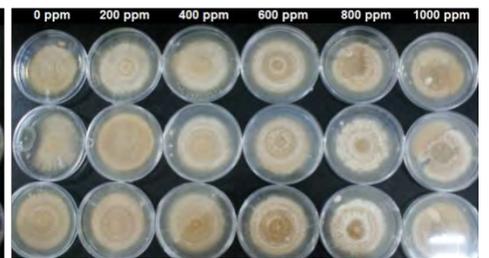
C6



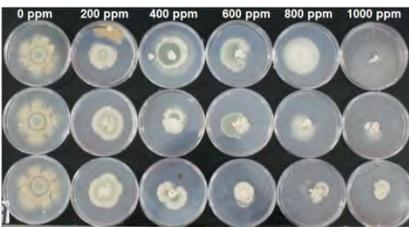
C7



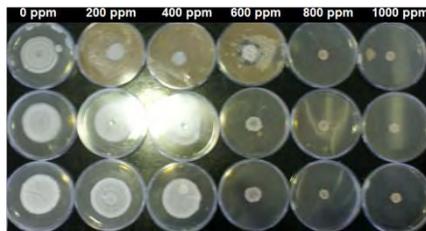
C8



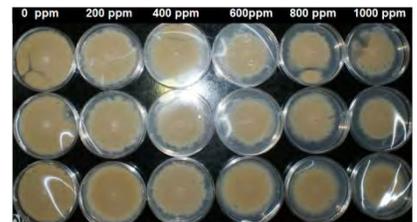
C9



C10A



C10B



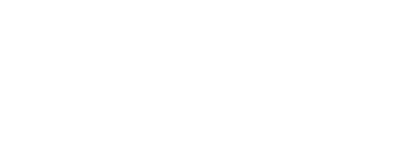
C11

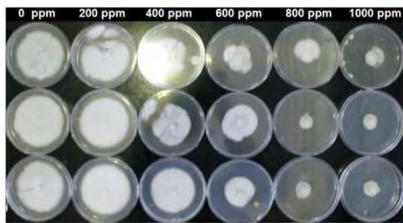


C12

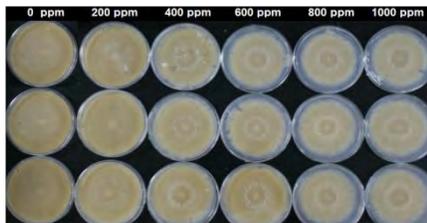


C13

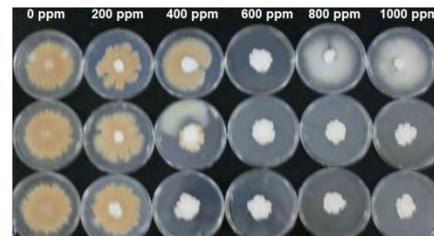




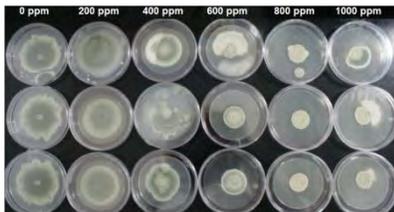
C14



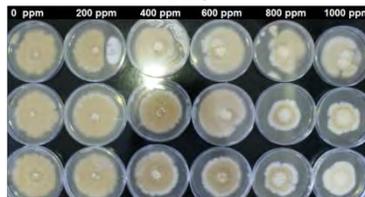
C15



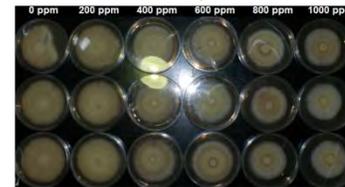
C16



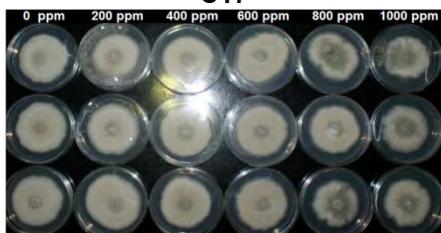
C17



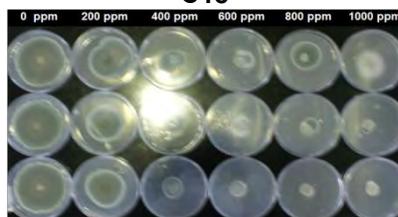
C18



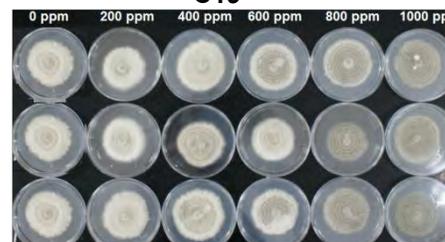
C19



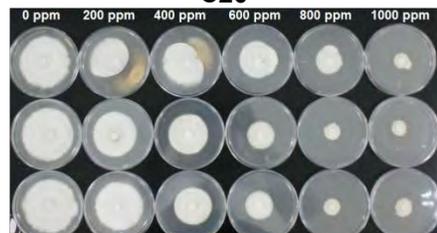
C20



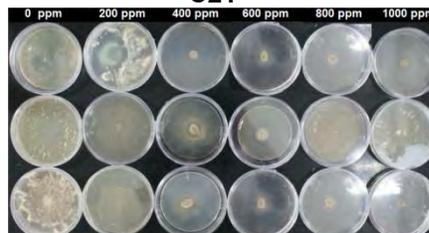
C21



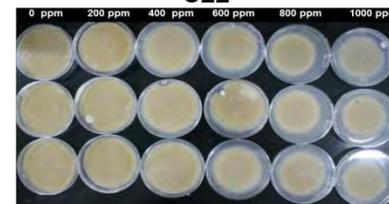
C22



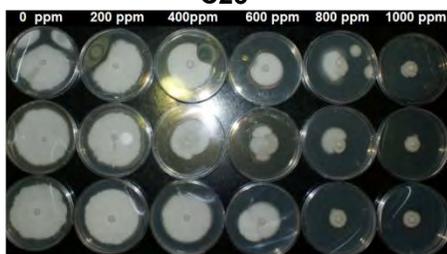
C23



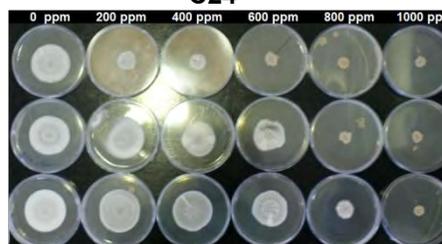
C24



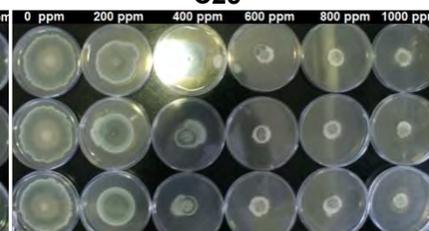
C25



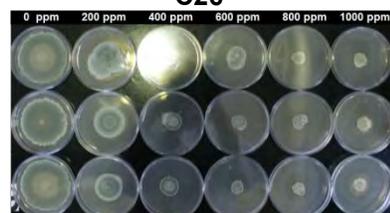
C26



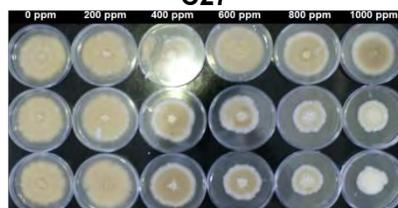
C27



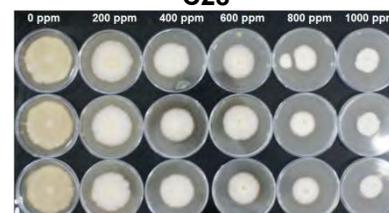
C28



C29



C30



C31

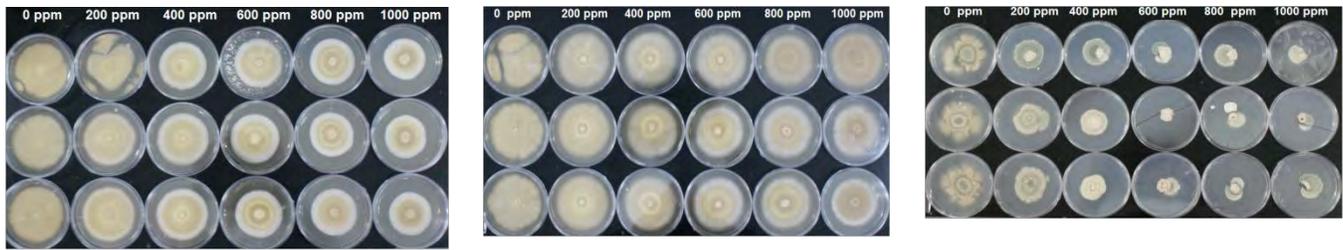


Fig. 16. Prueba de tolerancia de cepas fúngicas aisladas.

Cuatro de las cepas fúngicas aisladas sobresalieron por su tolerancia a concentraciones altas de PAHs determinadas por su Vcr. La tolerancia de estas cepas puede deberse a las diferencias en la pared celular. Se sabe que la pared celular de algunas especies del genero *Paecilomyces* (al cual pertenece *Talaromyces*) tienen una membrana externa a la pared, la cual consiste en un núcleo de α -manopiranososa (1,6). A diferencia de las especies de *Penicillium* en el cual el núcleo de mananos es corto y las ramificaciones de galactofuranos son más largas (Domenech y col., 1999). De acuerdo a la literatura el enlace glicosídico entre los anillos furanosos es más débil comparado con los anillos piranosos. La solubilidad depende del contenido de las unidades de galactosa presentes. Así que, se puede asumir que la pared de *T. spectabilis* SCO12 es más resistente que la pared de especies de *P. chrysogenum* SCO7A.

También se ha sugerido que los hongos filamentosos pueden permanecer en contacto con compuestos hidrofóbicos y mejorar su transporte mediante fenómenos de superficie (van Groenestijn and Liu, 2002) relacionados a la presencia de hidrofobinas (Muñoz y col., 1997), pequeñas proteínas antipáticas (~100 aminoácidos) involucradas en el crecimiento aéreo, la formación de canales de aire para el intercambio de gases y el aumento en la resistencia a la desecación (Wessels 1997; Wösten 2001; Linder y col. 2005)

Una respuesta cuantitativa de cada cepa a 1000 ppm de PAHs basada en su Vcr también fue analizada (Fig.17). Con lo cual se determino que nueve de las cepas fúngicas de *Aspergillus terreus* presentaban un Vcr en el rango de 0.55-0.604 cm dia⁻¹ a una concentración de 1000 ppm (C1, C2A, C3, C4A, C8, C16, C28, C29 y C30). Sin embargo, su esporulación fue afectada desde 800 ppm de PAHs. Cuatro de las cepas mostraron una inhibición a partir de 400 ppm de PAHs (C4B, C4C, C15 y C29), y 19 de las cepas no mostraron tolerancia desde 200 ppm lo cual se observó en su baja velocidad de crecimiento y la falta de esporulación (C4D, C6, C13, C9, C10A, C11, C13, C14, C18, C21, C23, C24A, C25B, C26B, C27, C28, C31 y C32). En este último grupo se encontraron las cepas de *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium*, *Neosartorya*, y *Neurospora*.

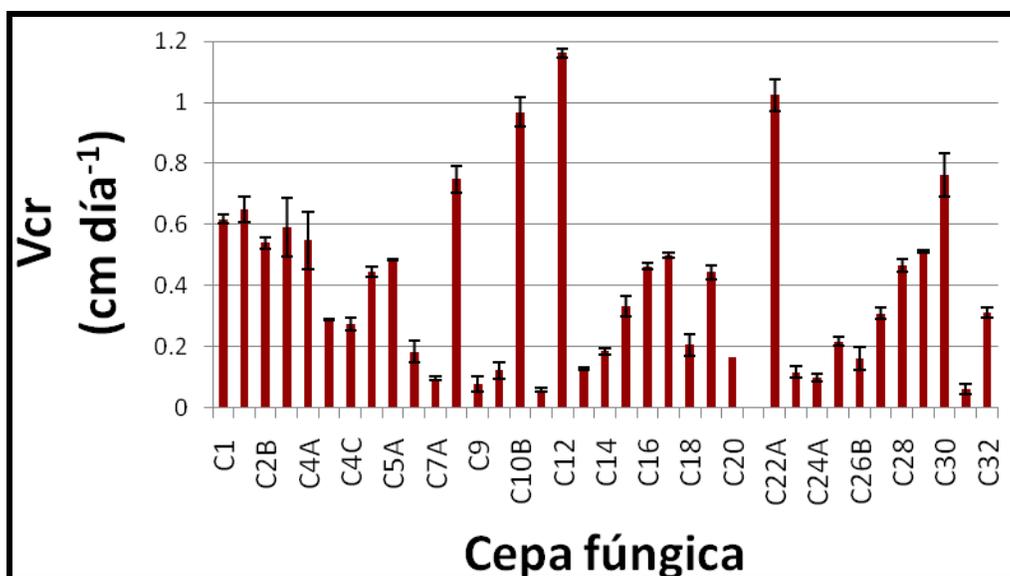


Fig 17. Velocidad de crecimiento radial en 1000 ppm de PAHs

En este trabajo se encontraron cepas fúngicas con diferentes niveles de tolerancia a PAHs las cuales podrían aplicarse a sistemas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Las cepas del género *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Penicillium* y *Pseudallescheriya* (*Pseudosporium*) ya han sido reportadas como hongos cultivables degradadores de petróleo (Davis y Prenafeta.-Boldú, 2001, 2002, 2004, 2006). *Fusarium* y *Paecilomyces* incluso han sido reportados como hongos que tienen la capacidad de degradar lignina aunque su habitat sea el suelo (Kluczek-Turpeinen, 2003, Hao y col., 2006, Saparrat y Hammer, 2006, Singh y Tharcur, 2006).

Entre los nueve géneros mostrados, cuatro aislados fúngicos designados como *Aspergillus terreus* SCO2B, *Fusarium verticillioides* SCO5A, *Talaromyces spectabilis* SCO12 y *Scedosporium apiospermum* SCO17, mostraron una tolerancia a concentraciones altas de PAHs debido a que su Vcr fue significativamente mantenida aun en la presencia de 1000 ppm de una mezcla de PAHs sin que la densidad micelar se haya visto reducida. Por esta razón se evaluó su Vcr en presencia de 2000 ppm de PAHs (Fig. 18).



Fig. 18 Tolerancia de las cepas seleccionadas a 2000 ppm de PAHs

Se mostro que *Fusarium* y *Talaromyces* puede sobrevivir a concentraciones de PAHs tan altas como 2000 ppm. Sin embargo, el crecimiento de *A. terreus* y *Scedosporium apiospermum* fue significativamente reducido en un 50 % de su Vcr en comparación con la Vcr observada a 1000 ppm de PAHs.

10.4 Selección secundaria (Crecimiento en cultivo sólido)

La segunda selección se baso en adaptar las cepas seleccionadas: *A. terreus* SCO2B, *F. verticillioides* SCO5A y *T. spectabilis* SCO12, al cultivo sólido. En este estudio, cada cepa fue precrecida en un texturizante lignocelulosico como el bagacillo de caña.

Hoy en día, el uso de residuos agroindustriales o subproductos tiene diversas aplicaciones. Unos son usados para la producción de biocombustibles mediante fermentación, directamente usados como combustibles en calentadores, o como alimento para ganado. Sin embargo, estos materiales pueden ser usados como una fuente alterna de carbono que como se describe en este trabajo, puede mejorar significativamente el crecimiento de los microorganismos.

10.4.1 Estandarización de las condiciones de crecimiento en cultivo sólido de las cepas seleccionadas.

La selección secundaria se basó en la adaptación de los hongos seleccionados: *A. terreus* SCO2B, *F. verticillioides* SCO5A y *T. spectabilis* SCO12, al cultivo sólido. En este estudio cada cepa fue precrecida en un texturizante lignocelulósico como el bagacillo de caña, impregnado con tres medios de composición diferentes pero con glucosa como fuente primaria de carbono. Los primeros experimentos estuvieron enfocados en el estudio de algunos aspectos desconocidos del crecimiento de cada cepa fúngica sobre cultivo sólido. Algunos de estos aspectos incluyen: la determinación del inicio de la fase exponencial con el objetivo de seleccionar el tiempo de adición del suelo contaminado en experimentos subsecuentes, y finalmente, el efecto que podría tener la presencia del suelo contaminado sobre el crecimiento del hongo en el sistema.

La fase de adaptación de *A. terreus* HCS2B con el medio mínimo (MM) toma todo un día. El inicio de la fase exponencial se da en el día dos de la fermentación, la fase estacionaria toma lugar en el día 4 que dura poco menos de 24 horas con una producción máxima de 0.045 mol de CO₂. Finalmente se presume que la fase de esporulación comienza en el día 5 pues la producción de CO₂ comienza a disminuir hasta que no se puede cuantificar lo cual sucede desde el día 7. Mientras que con el medio Toyama's la fase de adaptación es tan rápida que no se puede diferenciar del inicio de la fase exponencial. Con este medio la fase estacionaria se alcanza en el día dos de la fermentación y dura 4 días más hasta que en el día 7 no se puede cuantificar la producción de CO₂. Sin embargo, en el día 8 hay nuevamente producción de CO₂ con lo cual se presume que el microorganismo podría estar utilizando ya la fuente alterna de carbono del bagacillo de caña. Finalmente el medio mínimo 2 (MM2) mantiene al microorganismo activo por menos tiempo, pues se observa que en el día 6 no hay respiración. La micrografía demuestra que el hongo aunque no es ligninolítico tiene la capacidad de invadir el bagacillo de caña produciendo compuestos con tonalidades oscuras a diferencia de los hongos ligninolíticos (Fig. 19).

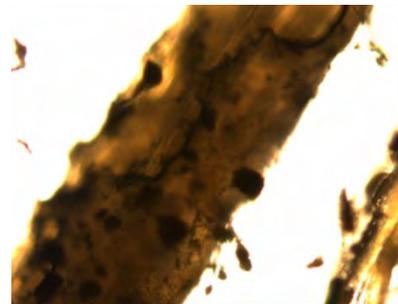
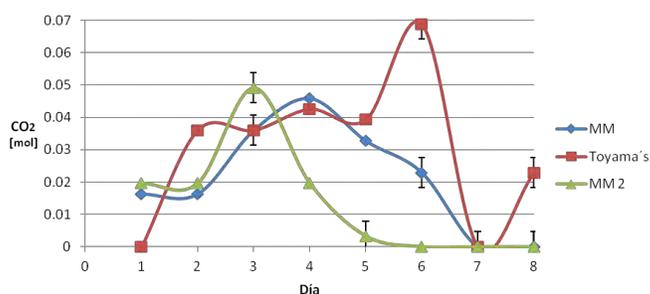


Fig. 19 Crecimiento de *A. terreus* HCS2B sobre bagacillo de caña.

La fase de adaptación *F. verticillioides* HCS5 sobre bagacillo de caña impregnado con cualquiera de los tres medios evaluados (MM, Toyama's, MM2) se da en las primeras horas de cultivo. En el primer día de fermentación también da inicio la fase exponencial, que termina en el día 2 tanto para el cultivo llevado a cabo con MM como con MM2. Sin embargo con el medio Toyama's la fase exponencial se extiende hasta el día 4 en el que comienza la fase estacionaria, a diferencia de los otros dos cultivos que para este tiempo ya declinan su producción de CO₂. Aunque el agotamiento de la fuente primaria de carbono coincide con los cultivos en MM y MM2 (día 6), la producción de CO₂ en el cultivo con Toyama's nunca es tan cercano a cero. El inicio de la utilización de la fuente de carbono en el día 8 hace suponer que se puede tener al microorganismo activo por periodos largos de tiempo si se cultiva inicialmente con medio Toyama's. El crecimiento de *F. verticillioides* HCS5 en bagacillo de caña se da tanto superficial como interno pero sin la producción del efecto de pudrición oscura (Fig. 20).

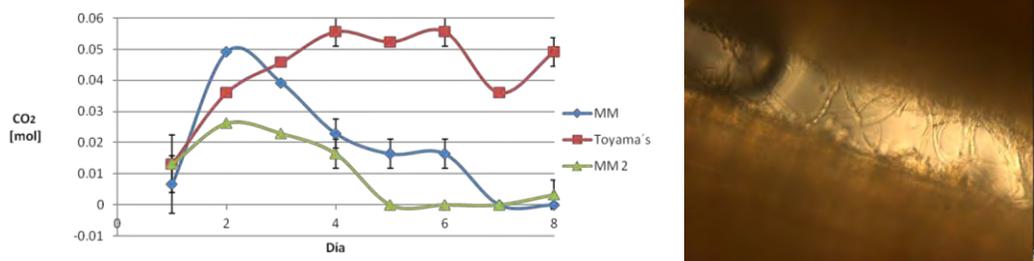


Fig. 20 Crecimiento de *F. verticillioides* HCS5 sobre bagacillo de caña.

La composición del medio Toyama's fue determinante para el crecimiento de *T. sepectabilis* HCS12 en cultivo sólido. No solo por el inicio a corto plazo de la fase exponencial, lo cual ocurre en el día uno de la fermentación, sino por la mayor duración de la fase estacionaria que comienza en el día dos extendiéndose al día 4. Con este medio, la respiración no disminuye tanto como con los otros dos medios permitiendo al microorganismo prepararse para el consumo de la fuente alterna de carbono que comienza en el día 8. *Talaromyces sepectabilis* HCS12 al igual que *A. terreus* HCS2B tiene la capacidad de crecer dentro de las fibras del bagacillo, tomando la ventaja de utilizar sus nutrientes como fuente alterna de carbono cuando la glucosa del medio inicial se ha agotado. (Fig. 21).

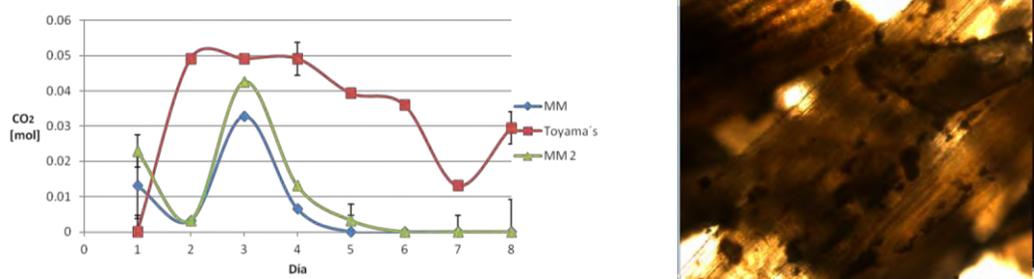


Fig. 21 Crecimiento de *T. sepectabilis* HCS12 sobre bagacillo de caña.

El comienzo de la fase exponencial en ambos *T. spectabilis* SCO12 como *A. terreus* SCO2B, bajo estas condiciones de crecimiento, ocurren en el segundo día de fermentación. Así que, para evitar cualquier inhibición del microorganismo debido a la toxicidad en etapas tempranas del crecimiento, la adición del suelo contaminado se realizó en el segundo día de fermentación. En cuanto a la humedad *A. terreus* SCO2B presenta un mayor crecimiento (observado por el crecimiento micelial y la producción de CO₂) con 30% (v / p) humedad, 35% de humedad para *T. spectabilis* SCO12 35% y el 40 % es óptimo para el crecimiento de *F. verticillioides* SCO5A

Actualmente, el uso de residuos agroindustriales o subproductos tiene diversas aplicaciones. Algunos de ellos sirven como sustrato en fermentaciones dirigidas a la producción de biocombustibles, otros son usados directamente como combustibles para calentamiento o como alimento para ganado. Sin embargo, todos estos materiales pueden ser usados como fuente alternativa de carbono que, como se describe en este trabajo, puede mejorar significativamente el crecimiento de microorganismos.

10.4.2 Estandarización de las condiciones de extracción

Las mezclas de hexano-acetona en relación 1:1 rindieron eficiencias por debajo de 80% aun en tiempos de reflujo de 60 minutos. La mayor eficiencia de extracción se consiguió utilizando una mezcla de hexano-acetona en relación 1:2, pero con tiempos cortos de reflujo. Se observó que con esta mezcla, el aumento en el tiempo de tratamiento es inversamente proporcional a la eficiencia (Tabla 20). Por lo tanto las condiciones de extracción para los experimentos de remoción en cultivo sólido son: 30 ml de una mezcla de hexano-acetona en relación 1:2, 40 minutos de reflujo, con una energía de 800 W.

Tabla 20. Eficiencia de extracción

Hexano:acetona	Tiempo de reflujo (min)	Eficiencia (%)
1:1	40	44
1:1	50	56
1:1	60	76
1:2	40	98.7
1:2	50	98.4
1:2	60	78.9

10.4.3 Remoción de Phe y Py en cultivo sólido

Partiendo del conocimiento de que las cepas seleccionadas son capaces de crecer en contacto directo con una mezcla de PAHs sobre cultivo superficial, se creó la hipótesis de que también tendrían la capacidad de sobrevivir en presencia de suelo contaminado con Phe y Py. Debido a que, por su recalcitrancia, estos xenobioticos se integran en los poros de la partículas sólidas como el suelo y por lo tanto el contacto microorganismo-xenobiotico en cultivo solido no sería tan directo como lo es en cultivo superficial. La necesidad de tener la certeza de la sobrevivencia de las cepas seleccionadas en cultivo sólido con suelo contaminado con PAHs, llevo a realizar un experimento de remoción. Basado en la prueba de tolerancia, el suelo se contamina con una mezcla de PAHs (a una razón 1:1 de Phe y Py) a una concentración final de 2000 mg kg⁻¹ de suelo.

El crecimiento revelado en este estudio fue similar al patrón clásico de degradación de PAHs (Serrano Silva y col., 2009) donde la disminución del crecimiento solo ocurrió cuando el suelo contaminado fue adicionado. Aunque la sobrevivencia de cada hongo se verifico por la producción de CO₂ durante dos semanas.

En la ausencia de PAHs, el crecimiento de las cepas fúngicas se mantuvo. Sin embargo, la presencia de PAHs obviamente afecto el crecimiento de los aislados fúngicos (Fig 22).

La cepa *T. spectabilis* SCO12 mostro el mayor crecimiento seguido de *F. verticillioides* SCO5A. Aunque en cultivo solido, el hongo tenía menos contacto con la sustancias toxicas, *A. terreus* SCO2B mostro el crecimiento más bajo, lo cual confirma la inhibición observada en el cultivo superficial con 2000 mg PAHs kg⁻¹ (Fig. 20). Como ya se ha reportado, los residuos lignocelulosicos permiten al hongo posicionarse para penetrar posteriormente en los más profundo de las partículas des suelo y servir no solo como sustrato para el crecimiento, sino también como almacén de humedad y además protege al micelio. Esto mejora la sobrevivencia del hongo en el suelo donde se enfrenta con otros microorganismos o compuestos tóxicos (Canet y col., 2001).

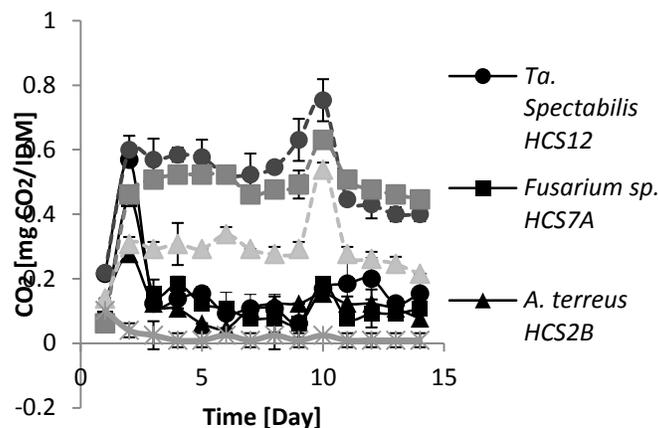


Fig. 22 Crecimiento de las cepas seleccionadas en cultivo sólido con suelo contaminado con PAHs

————— 2000 ppm PAHs
..... 0 ppm PAHs

Después del análisis de la producción de CO₂ por efecto de la respiración de cada microorganismo en presencia y ausencia de PAHs, la cuantificación de remoción de cada compuesto también es importante (Fig.23).

La eficiencia de cada cepa para remover PAHs fue calculada de la cantidad de Phe y Py remanentes usando extracción asistida por microondas. Un buen acercamiento al porcentaje de remoción depende de la eficiencia de la técnica de extracción la cual debe ser de preferencia igual o mayor que el 90%. La porción no recuperada de PAHs puso deberse a la volatilización por el proceso de aireación, especialmente con fenantreno, la oxidación abiótica y la adsorción irreversible sobre las partículas del suelo y/o la superficie de los reactores (Novotný et al., 1999).

Aunque la pérdida de Phe y Py a través de la adsorción física y la foto-oxidación se observó, esta fue baja (<10% en 14 días de incubación). Después de sustraer la pérdida abiótica, el total de biodegradación de Phe por *F. verticillioides* SCO5A después de dos semanas de incubación fue 19–26 % de la cantidad inicial. Aunque, es el mayor porcentaje de remoción de Phe este fue similar al obtenido por *A. terreus* SCO2B (22-25 %) y por el obtenido para *T. spectabilis* SCO12 (17-27 %). Los resultados de remoción complementados con la producción de CO₂ muestran que no hay una relación directamente proporcional entre ellos (Fig. 22 y 23). Es decir que la mayor producción de CO₂ no asegura también una mayor remoción. En cuanto a la remoción de Py *T. spectabilis* SCO12 demostró mayor eficiencia de degradación (20 %) que *F. verticillioides* SCO5A y *A. terreus* SCO2B, los cuales degradaron 17 y 15 % del Py en un lapso de 14 días de incubación, respectivamente.

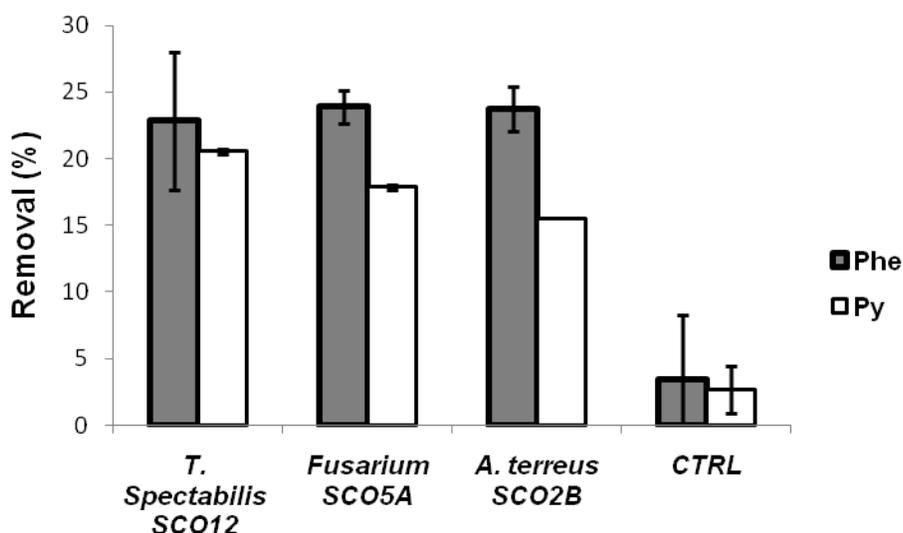


Fig. 23 Remoción de Phe y Py en cultivo sólido por las cepas seleccionadas

Los porcentajes de la remoción alcanzados por *T. spectabilis* SCO12, *F. verticillioides* SCO5A y *A. terreus* SCO2B no mostraron una diferencia significativa en la remoción de Phe. Aun así, la remoción de Phe es considerado alto si se compara con el porcentaje de degradación que rinde el hongo modelo *P. chrysosporium* el cual remueve 40% de Phe, 34.6% Py y 17% BaP, sobre todo si se tiene también en consideración que estos porcentajes son alcanzados en una lapso de 19 días por *P. chrysosporium* y que además se llevaron a cabo con una concentración inicial de PAHs muy baja (30 mg kg^{-1}) (Wang et al., 2009)

Aunque las cepas de *P. ostreatus* reducen las concentraciones de antraceno, pireno y fenantreno en porcentajes de 81–87%, 84–93% y 41–46%, respectivamente, esta remoción fue obtenida en un periodo de cuatro meses el cual es bastante largo y además partiendo de una cantidad muy baja de PAHs (50 mg de cada PAH kg^{-1} suelo). Por otro lado la remoción causada por *P. chrysosporium* y *T. versicolor* en el mismo estudio fue mucho mas baja debido a su baja capacidad de colonizar el suelo (Novotný et., al 1999). Incluso *T. versicolor* ha sido catalogada también en otros trabajos como incapaz de colonizar suelo no estéril (Martens & Zdražil, 1998).

Los resultados antes expuestos nos confirman que los hongos ligninolíticos no son capaces de colonizar el suelo, y que concentraciones altas de PAHs les son toxicas, estas son por lo tanto características que limitan la biorremediación de suelos contaminados. Aunque cepas como *P.ostreatus* alcanzan porcentajes de remoción mayores al 80% de Py al final la cantidad removida es de 40 mg Kg^{-1} suelo, mientras que *T. spectabilis* HCS12 remueve al menos 200 mg Kg^{-1} suelo en menos tiempo.

Una vez comparados los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos por hongos ligninolíticos también es de interés hacer una comparación de la remoción de PAHs por otros hongos aislados de suelo. Se encontró que un hongo no ligninolítico *A. terreus* aislado de suelo contaminado con (PAHs) rendía un 60% y 27.5% de disminución de pireno y benzo(a)pireno respectivamente en cultivo sumergido adicionado con 50 y 25 mg L^{-1} respectivamente después de nueve días de cultivo. Es importante resaltar que aunque la remoción de Py fue alta, la concentración inicial fue de apenas 50 ppm. Esto da como resultado la remoción final de 30 ppm de Py. La cepa de *A. terreus* metaboliza pireno y B(a)pireno por una reacción similar a la reportada previamente para hongos no ligninolíticos con un mecanismo que sugiere la hidroxilación por una monoxigenasa citocromo P-450 seguida de la conjugación con un ion sulfato (Capotorti y col., 2004). En otros estudios la degradación cometabolica con glucosa 5 mg kg^{-1} suelo reporta que *A. terreus* degrado aproximadamente un 35% de Phe y 23% de Py. Mientras que una cepa de *Penicillium sp.* degrado 62% de Phe y 48 % de Py. En un suelo contaminado con $589.3 \text{ mg PAHs kg}^{-1}$ suelo. La concentración inicial de Phe y Py fue de 106.2 y 94.8 mg kg^{-1} suelo. (Jeong-Dong y Choul-Gyun, 2007). En ninguno de los estudios reportados se encontró una cantidad de remoción de Phe y Py tan alta como la que nosotros reportamos para los hongos *T. spectabilis* HCS12, *F. verticillioides* HCS5A y *A. terreus* HCS2B.

La razón de diferentes comportamiento de cepas en el cultivo solido con otros del mismo género y especie en otros trabajos podría deberse a que, en nuestro estudio, la biodegradación fue llevada a cabo en la presencia de una concentración inicialmente alta de PAHs (2000 mg kg⁻¹ suelo) con cepas fúngicas aisladas directamente de suelos altamente contaminados con hidrocarburos pero precrecidas en bagacillo de caña. Es también conocido que los PAHs de bajo peso molecular pueden afectar la degradación de los PAHs de alto peso molecular, y viceversa, vía cometabolismo, inducción de la actividad enzimática por intermediarios de degradación relacionados o vía inhibición competitiva o toxicidad (Dean-Rosset y col., 2002). En este estudio el porcentaje de remoción es atribuido solo a la actividad de cada hongo sin embargo, en otros trabajos llevados a cabo bajo condiciones no estériles la remoción es favorecida por la cooperación metabólica de muchos microorganismos que pueden resultar en la utilización mejorada de PAHs, ya que los intermediarios producidos por algunos microorganismos pueden servir como sustrato para el crecimiento e otros. Por lo tanto las enzimas ligninolíticas pueden competir por los mismos sustratos y los radicales formados interactúan unos con otros o con los metabolitos fúngicos y dan paso a la generación de otros radicales que continúan el proceso (Anastasi y col., 2009).

En este trabajo se observó una remoción significativa de pireno de los cultivos en suelo por la cepa *T. spectabilis* SCO12 la cual muestra un 20 % de remoción que representa 1.15 veces la remoción alcanzada por *F. verticillioides* SCO5A y 1.32 veces la obtenida por *A. terreus* SCO2B dentro de 14 días de un suelo donde los PAHs estaban presentes a las concentraciones de 1000 de Phe y 1000 Py mg kg⁻¹ suelo. Esto documenta la eficiencia de estas cepas para remover Py del suelo y refrenda la habilidad de *A. terreus* de degradar PAHs en cultivo solido.

Por otra parte, el género *Fusarium* ya ha sido bioaumentado en residuos agroindustriales pero solo para degradar o modificar sustancias aromáticas de residuos del procesamiento de olivo lo cual se alcanzó en un 80% por un periodo de 20 semanas por *F. lateritium* (Sampedro y col., 2005). Sorprendentemente, los autores encontraron muchas oxidasas modificadoras de lignina, incluyendo lacasa, Mn-peroxidasa y la peroxidasa inhibida por Mn en cultivos en estado sólido. Es de importancia mencionar que la presencia de estas enzimas en cultivos con *Fusarium spp.* no es un conocimiento nuevo (Curir y col., 1997; Regalado y col., 1997; Saparrat y col., 2000). En relación con la aplicación del género *fusarium* en biorremediación se encontró también que, la oxidación de benzo(a)pireno por *Fusarium sp. E033* produce la formación de un metabolito intracelular dihidroxi dihidro-benzo(a)pireno mientras que el metabolito benzo(a)pireno-quinona se observó de una muestra extracelular. Estos resultados concuerdan con dos productos de transformación formados a partir de la ruta de degradación de benzo(a)pireno propuesta para *F. solani*, el cual involucra una monooxigenasa citocromo P-450 intracelular y enzimas peroxidasa de lignina extracelulares (Verdin y col., 2004). Así mismo, una cepa de *Fusarium sp.* aislada del suelo contaminado con PAH se probó en el suelo nativo para la degradación de PAH. El porcentaje de remoción por esta cepa fúngica fue de 27.5% de una concentración inicial de 793.92 mg PAHs kg⁻¹ suelo del cual 55% fue de 5-6 anillos, 38% de 4 anillos y 6% de 3 anillos cuya remoción fue de 30%, 20% y 20%

respectivamente. En cuanto al Phe, este, fue removido en un total de 11% mientras que el Py fue removido en un 24% (Potin y col., 2004)

En cuanto a *T. spectabilis* HCS12 se refiere, aunque se han aislado cepas relacionadas al género *Paecilomyces* (Fedorak y Westlake, 1986), al cual pertenece *Talaromyces*, este ha sido aplicado en la degradación de compuestos monoaromáticos como los BTEX (Benceno, tolueno, etil benceno y xilenos) como una fuente de carbono y energía. Estos compuestos se han tratado por separado y en mezclas en cultivo sumergido y en biofiltros empacados con los hongos filamentosos *Paecilomyces variotti* CBS115145. El tolueno fue degradado completamente, seguido del etilbenzeno, sin embargo el benceno fue asimilado solo (45%) igual que los m- y p-xilenos, mientras que solo el 30 % del o-xileno fue metabolizado (García-Peña et al., 2008). Estos compuestos están formados de solo un anillo aromático que además está activado por un grupo OH o un grupo metilo lo cual los hace un blanco de oxidación. Además, muchos estudios reportaron la capacidad de degradación de lignina de los hongos *Paecilomyces fusisporus*, *Paecilomyces varioti*, *Paecilomyces inflatus* y *Paecilomyces sp.* y la aplicación de estos últimos para la remoción de color de efluentes de la industria del papel (Kluczek-Turpeinen y col., 2003; Singh y Thakur, 2006). Sin embargo, nuestros resultados muestran el alto potencial de degradación de este género para ser aplicado en el desarrollo de procesos ecológicos debido a su capacidad de metabolizar PAHs.

Actualmente algunos de los mecanismos por los cuales los hongos pueden asimilar o escindir xenobioticos han sido dilucidados. Sin embargo, en *T. spectabilis* este mecanismo permanece aún incierto. Se ha postulado que cuando el mecanismo de hongos involucrados en la asimilación de hidrocarburos monoaromáticos está correctamente identificado y posicionados en un contexto filogenético, puede ser posible evaluar sistemáticamente la presencia de varias rutas metabólicas que pueden ser usadas en la biodegradación de tales materiales por otros organismos (Prenafeta-Boldu 2006). Tomando como base lo anterior, es posible que el sistema de degradación de *T. spectabilis* pueda ser el mismo que presenta *A. terreus*.

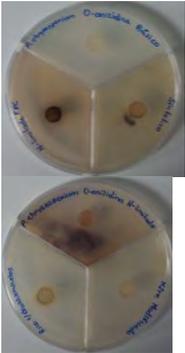
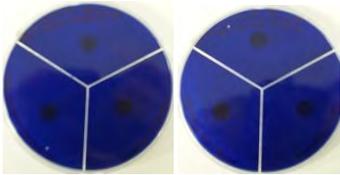
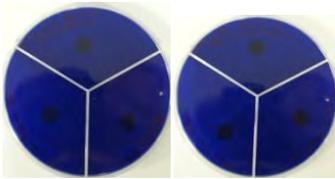
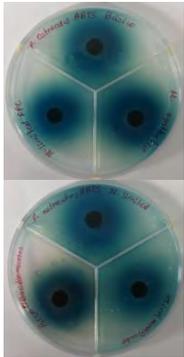
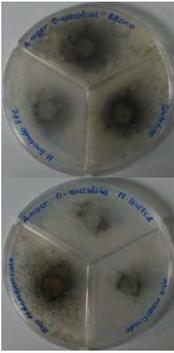
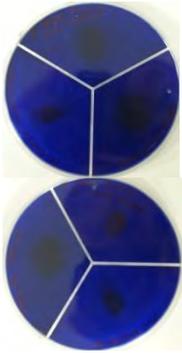
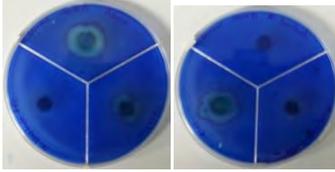
Como se ha visto las monooxigenasas y peroxidadas son las enzimas protagonistas en la degradación de xenobioticos. Sin embargo, la contribución de los lípidos peroxidados (LPO) u otros mediadores redox podrían estar mejorando la degradación de PAHs. Los LPO pueden iniciarse por la actividad de MnP (Bogan y Lamar 1996) y también se han observado como resultado de la actividad de MnPs de hongos degradadores de paja (Kapich y col., 2005). El metabolismo de los lípidos producen peróxido de hidrogeno (H_2O_2). En consecuencia, esto puede inducir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) (Hammel y col., 2002), los cuales pueden ser los agentes que inician la oxidación del BaP en el hongo *Fusarium solani*; los autores usan inhibidores específicos de peroxidases y de monooxigenasas cP-450 donde sorprendentemente, se observa la degradación no esperada de BaP. Esto indica que no solo los mecanismos enzimáticos están envueltos en la degradación de xenobioticos sino que también están involucradas otras

moléculas menores pero importantes (Veignie y col., 2004). Se ha hipotetizado que la producción de H₂O₂ y de ROS extracelulares, actúan como pequeños agentes no enzimáticos, los cuales juegan un papel esencial en la biodegradación de PAHs por *C. sphaerospermum*.

Hoy en día este es el primer trabajo sobre la degradación de PAHs usando *Fusarium verticillioides* y *Talaromyces spectabilis* en cultivo sólido con suelo contaminado con una alta concentración de PAHs.

10.5 Screening de enzimas oxidativas extracelulares en las cepas candidatas a mejora genética

Tabla. Oxidación de O-anizidina, Azure B y ABTS.

	MnP pH 4.5	LiP pH 3.0	Lacc pH 4.5
<i>P. chrysosporium</i>			
<i>P. ostreatus</i>			
<i>A. niger</i>			
<i>A. Terreus</i>			

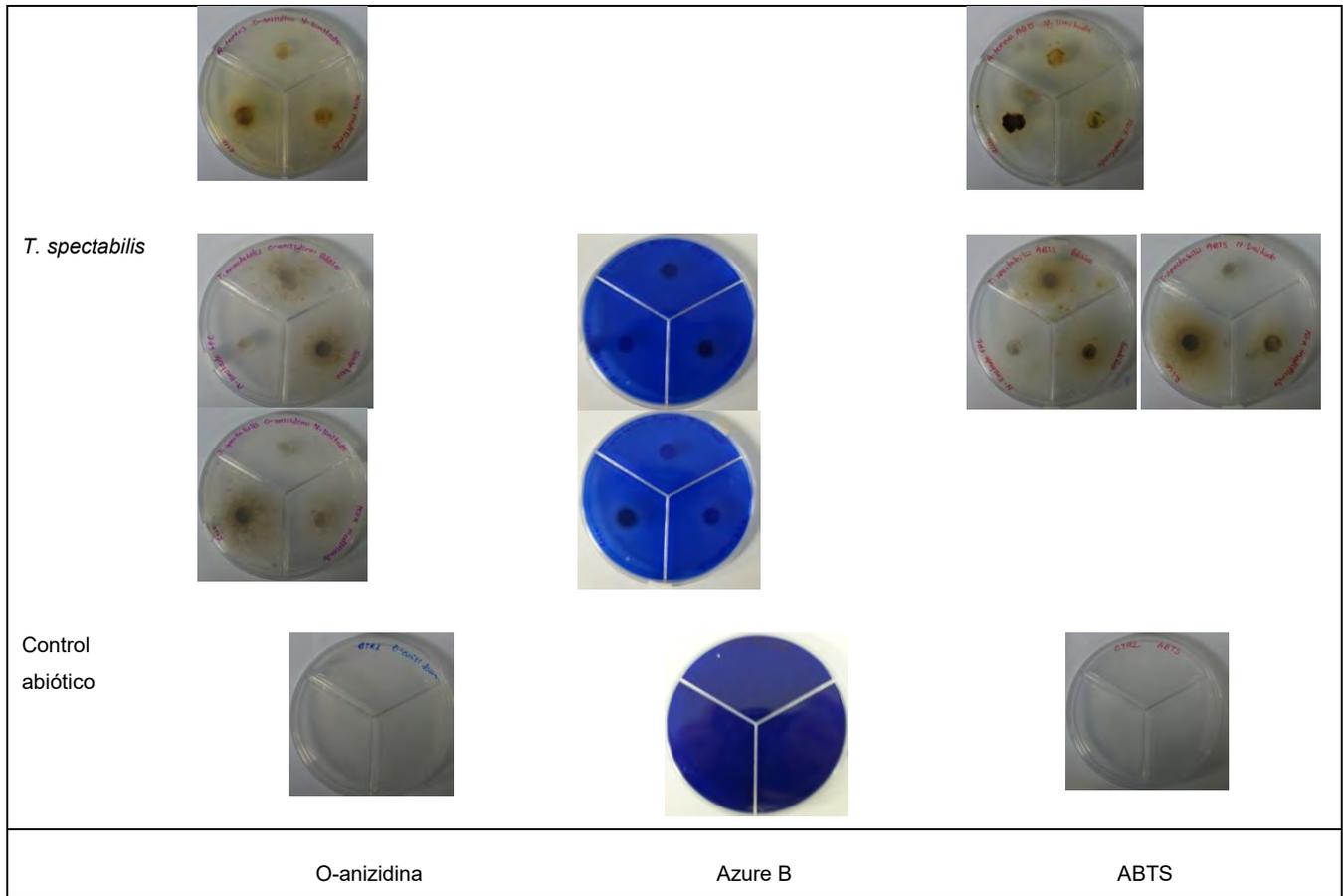
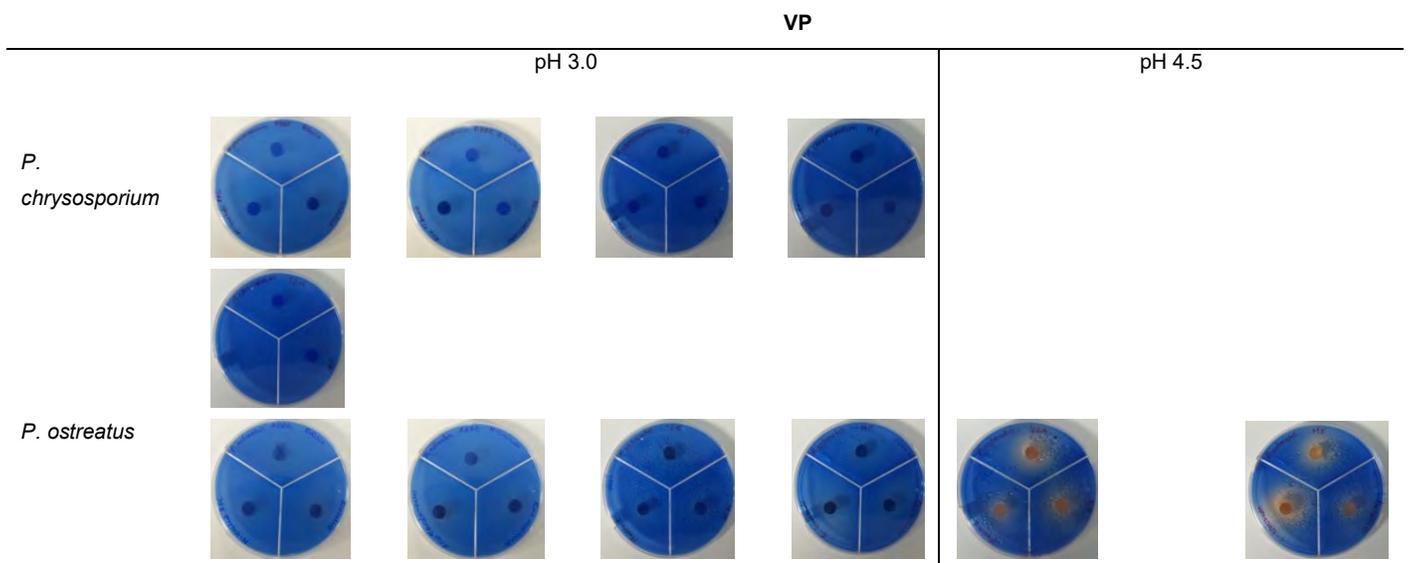


Tabla. Oxidación de RBBR por *P. ostreatus*, *A. terreus* y *T. spectabilis* a pH 3.0 y 4.5



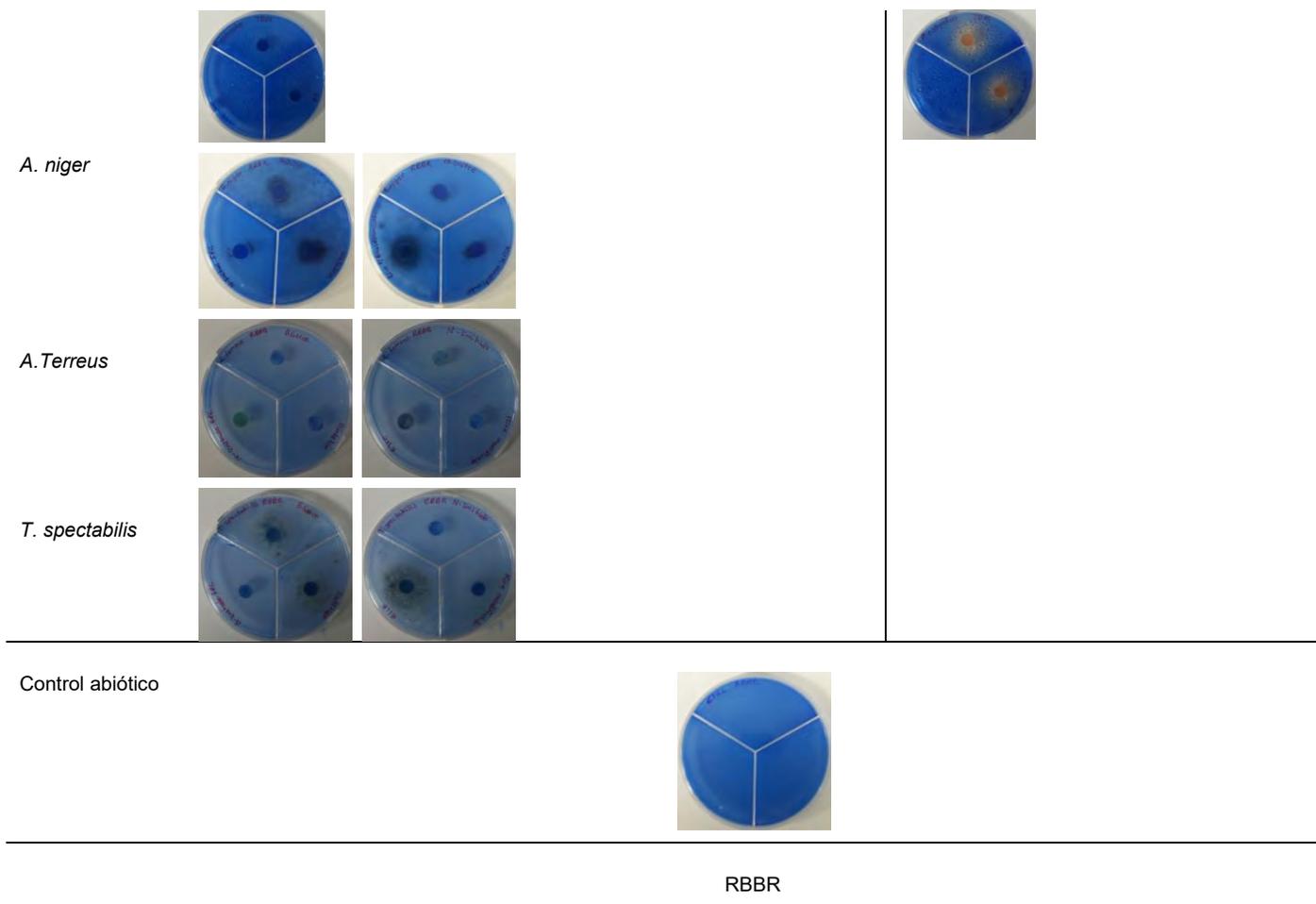
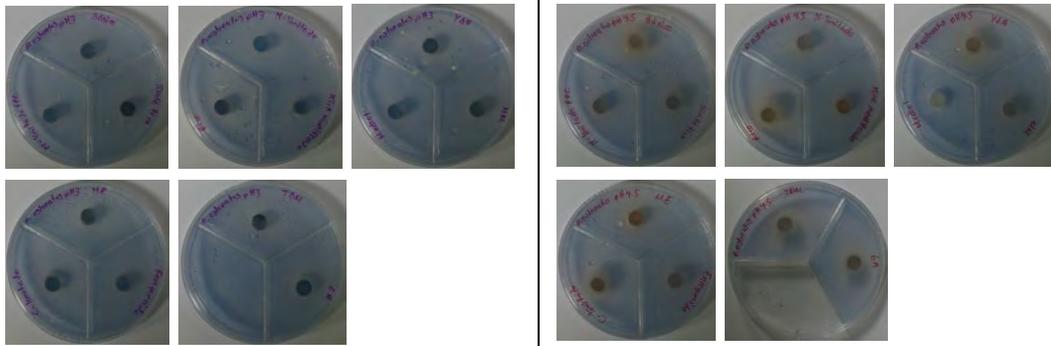


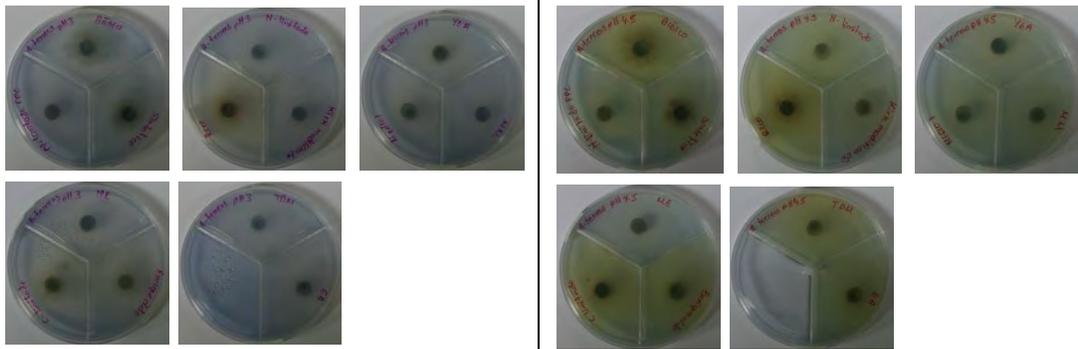
Tabla. Oxidación de Rblack5 por *P. ostreatus*, *A.terreus* y *T. spectabilis* a pH 3.0 y 4.5

VP	
pH 3.0	pH 4.5

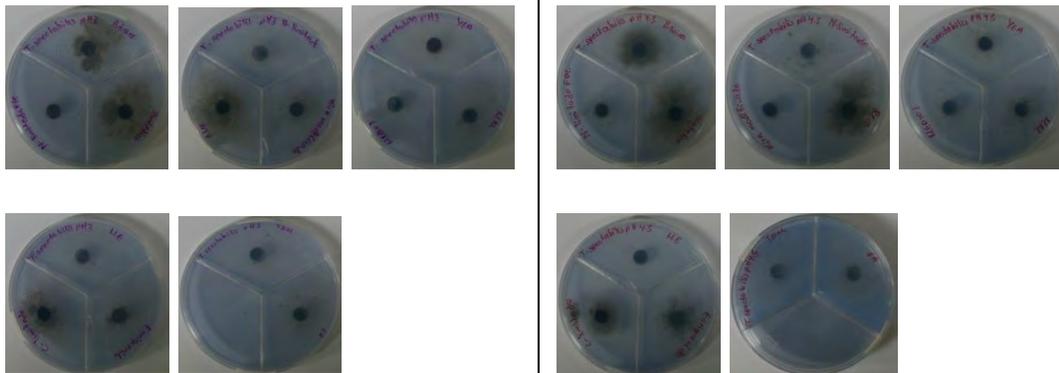
P. ostreatus



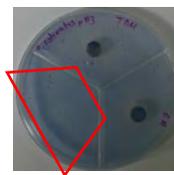
A. terreus



T. spectabilis



Control
abiótico



RBlack5

RBlack5

10.6 Pruebas de sensibilidad a antifungicos

Por su capacidad de tolerancia de altas concentraciones de PAHs así como por su capacidad de crecer en cultivo sólido y de remover eficientemente altas concentraciones de Phe y Py, las cepas seleccionadas como candidatas a transformación para la expresión del gen *vpl2* son: *A. terreus* HCS2B y *T. spectabilis* HCS12. Sobre estas cepas se llevaron a cabo estudios preliminares como las pruebas de sensibilidad a antifúngicos con el objetivo de seleccionar el marcador de selección de transformantes que sería incluido en el vector de expresión.

Se evaluaron inicialmente los antifúngicos carboxina, glufocinato y bleomicina. El ensayo se llevó a cabo en medio Czapeck y como se puede ver los controles sin antifúngico crecieron sin ningún problema. Mientras que *A. terreus* HCS2B se vio completamente inhibida cuando se puso en contacto con 1000 µg/ml de carboxina. El efecto de la carboxina sobre *T. spectabilis* HCS12 se observó en 800 µg/ml. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de glufocinato para *A. terreus* HCS2B y *T. spectabilis* HCS12 fue de 800 µg/ml. Frente al antifúngico bleomicina *A. terreus* HCS2B mostró una MIC menor (800 µg/ml) que la presentada por *T. spectabilis* HCS12 (1000 µg/ml) (Fig.24).

Microorganismo	Antifungico	MIC [µg/ml]	Crecimiento en placa					
			0	600	800	1000	1250	1500
<i>A. terreus</i>	Carboxina	1000						
<i>T. spectabilis</i>	Carboxina	800						
<i>A. terreus</i>	Glufocinato	800						
<i>T. spectabilis</i>	Glufocinato	800						
<i>A. terreus</i>	Bleomicina	800						
<i>T. spectabilis</i>	Bleomicina	1000						

Fig. 24 Sensibilidad de las cepas seleccionadas a diferentes antifúngicos.

El ensayo de sensibilidad a higromicina se llevó a cabo solo para *T. spectabilis* HCS12 y en concentraciones bajas. Este hongo presenta resistencia natural a higromicina aun a 500 µg/ml del antifúngico (Fig. 25) Por lo que el gen de resistencia a *hygB* no se puede usar como marcador de selección de transformantes.

0 100 200 300 400 500

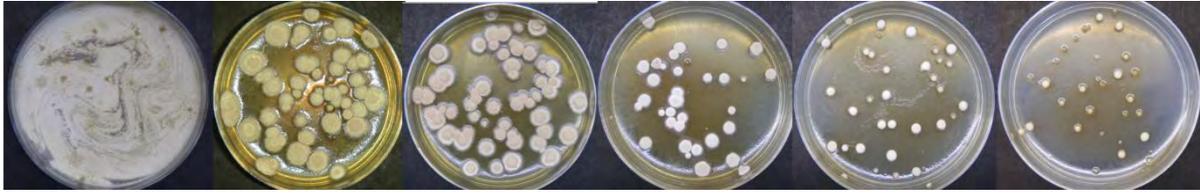


Fig. 25 Sensibilidad de *T. spectabilis* HCS12 a diferentes concentraciones de higromicina.

El método de transformación de *T. spectabilis* HCS12 por biobalística involucra la regeneración por 18 horas de las esporas que fueron baleadas. Esto implica que las esporas que no sufrieron tanto daño por el impacto de los microproyectiles podrían germinar y tener la ventaja de crecer ante $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de glufocinato aun sin haber integrado el gen de resistencia *bar*. Para desechar esta hipótesis se realizó un experimento donde esporas incubadas durante 18 horas se pusieron en contacto con la MIC de glufocinato calculada inicialmente para este microorganismo sobre medio Czapeck. Tomando como control las mismas esporas germinadas pero cultivadas en medio sin antifungico. Las esporas germinadas no fueron capaces de crecer ante $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de glufocinato (Fig. 26).

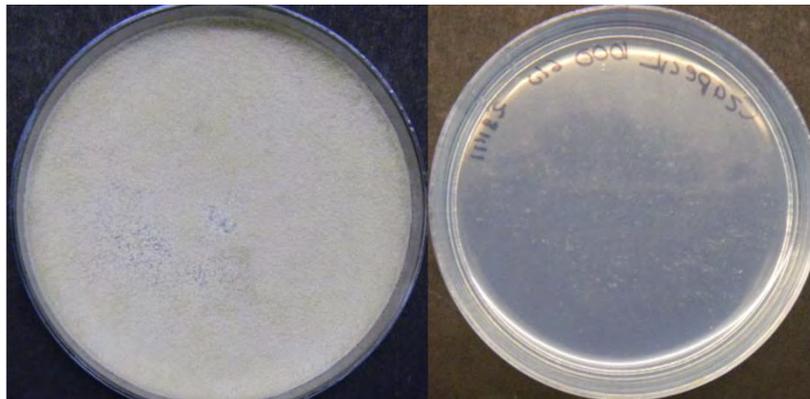


Fig. 26 Inhibición de esporas germinadas de *T. spectabilis* HCS12 por glufocinato

10.7 Germinación de esporas en cultivo sumergido y superficial

Las cinéticas de germinación de esporas de los microorganismos seleccionados se llevó a cabo debido a que se ha probado que las esporas germinadas resultan ser más competentes para recibir DNA foráneo antes de la división nuclear y la formación de septos (Robinson y Sharon 1999). Esto puede deberse a que la aparición del tubo germinal a través de la pared de la espora combina la degradación enzimática de una pequeña región localizada de la pared de la espora y la presión física ejercida por el protoplasma.

El tubo germinal puede surgir de una región predeterminada más delgada de la pared de esporas (poro germinal). Por lo tanto, la germinación *per se* involucra la generación de al menos una zona susceptible para crear poros por la aplicación de un campo eléctrico.

El tiempo de germinación puede variar incluso entre especies del mismo género por lo que fue necesario seguir una cinética de germinación. En general, se prefieren esporas con un tubo germinal de longitud 2 veces el diámetro de la espora lo cual asegura la presencia de esporas geminadas uninucleadas.

Las esporas de *A. terreus* HCS2B en cultivo superficial alcanzan un hinchamiento homogéneo en la hora 11. A las 12 h de incubación se observa la aparición de los tubos germinales que adquieren la longitud deseada hasta la hora 14 de incubación (Fig. 27).

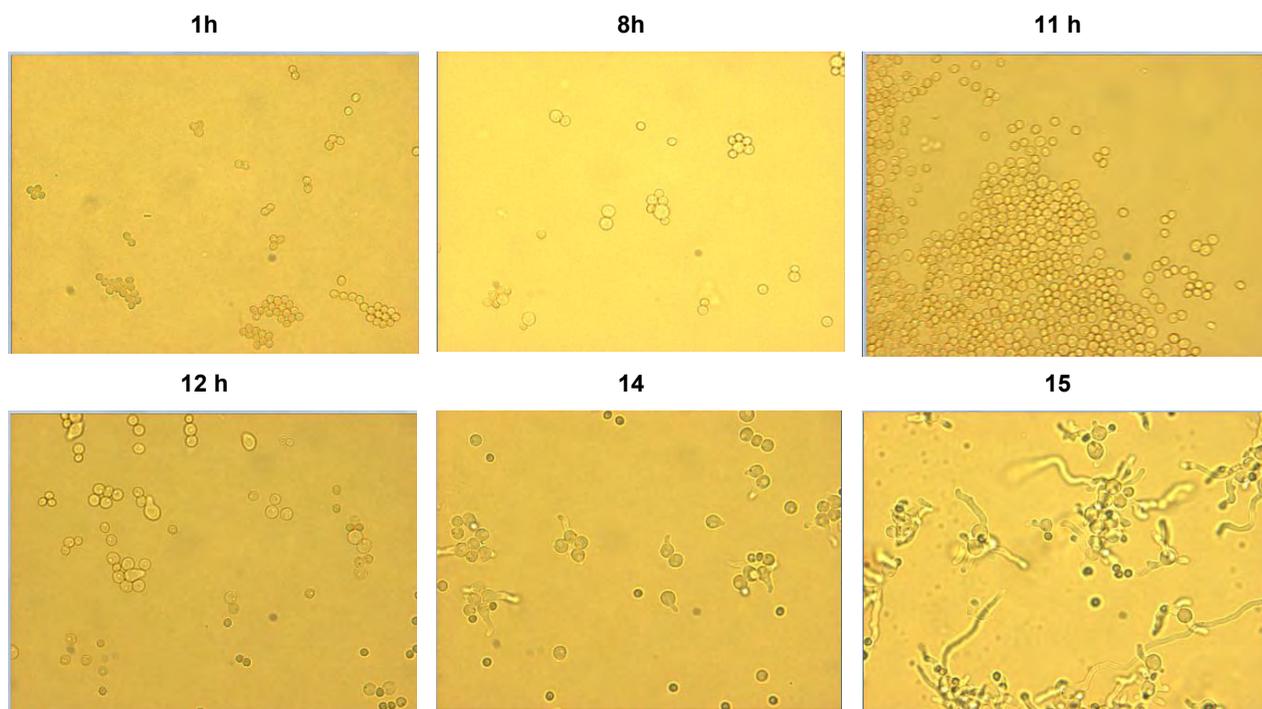


Fig. 27 Germinación de *A. terreus* HCS2B en cultivo superficial

Talaromyces spectabilis HCS12 en cultivo superficial comienza con la etapa de hinchamiento apenas transcurridas 2 h de incubación. Este fenómeno se observa más homogéneo en la hora 6 y finalmente los tubos germinales son observados en la hora 7 del cultivo (Fig. 28).

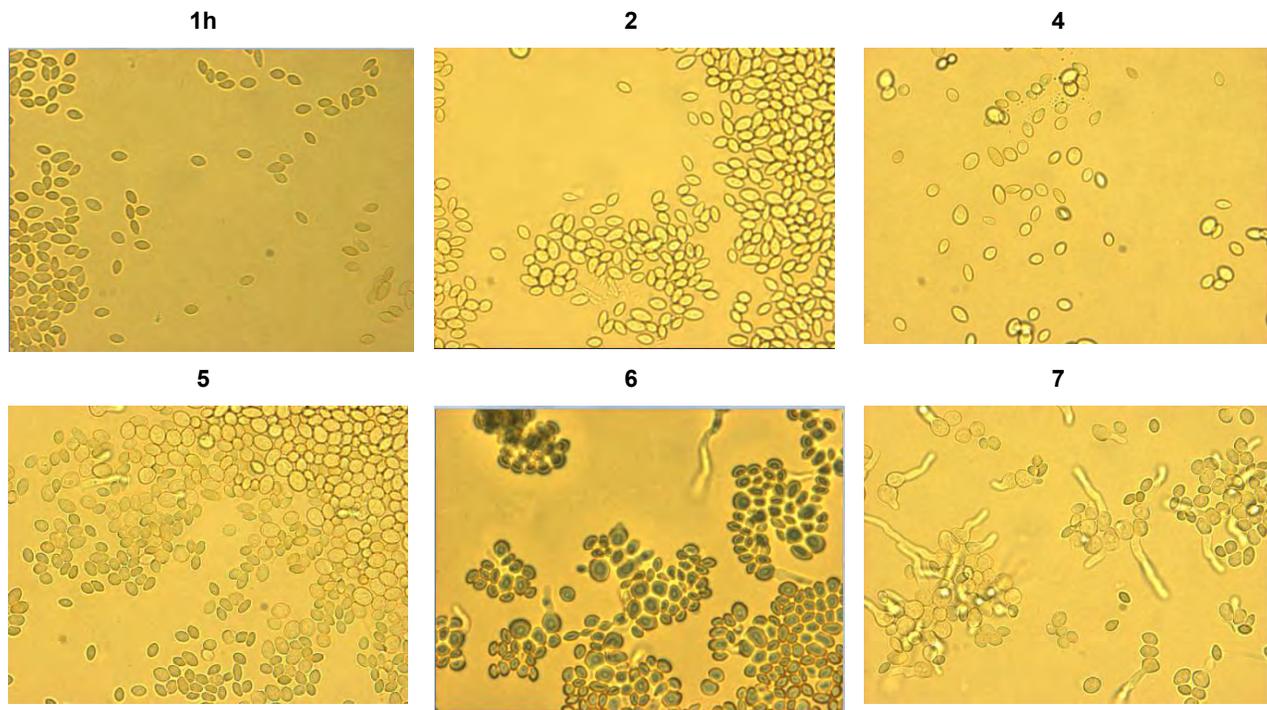


Fig. 28 Germinación de *T. spectabilis* HCS12 en cultivo superficial

En cultivo sumergido la etapa de germinación es alcanzada en un tiempo mucho menor comparado con el tiempo que toma alcanzar la germinación de las dos cepas seleccionadas en cultivo superficial. Las esporas de *A. terreus* HCS2B alcanzan la etapa de germinación en 9 h (Fig. 29), mientras que las esporas de *T. spectabilis* HCS12 toman apenas 6 h en alcanzar la germinación (Fig. 30).

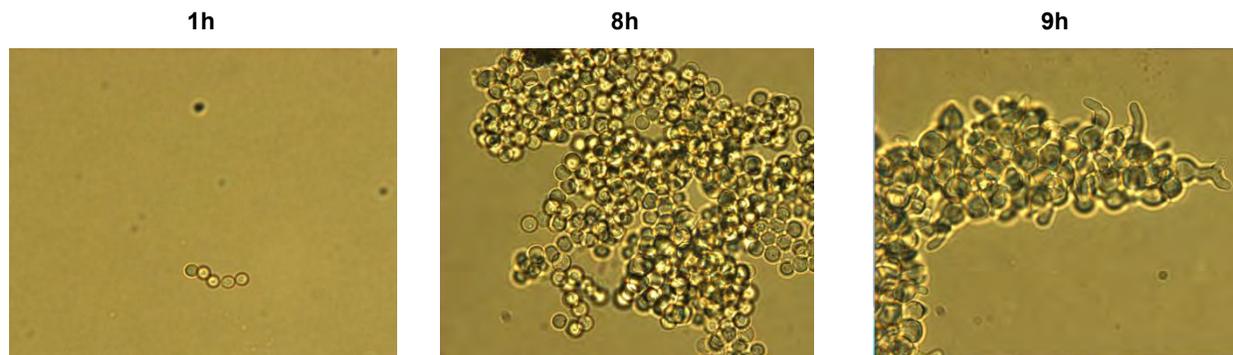


Fig. 29 Germinación de *A. terreus* HCS2B en cultivo sumergido

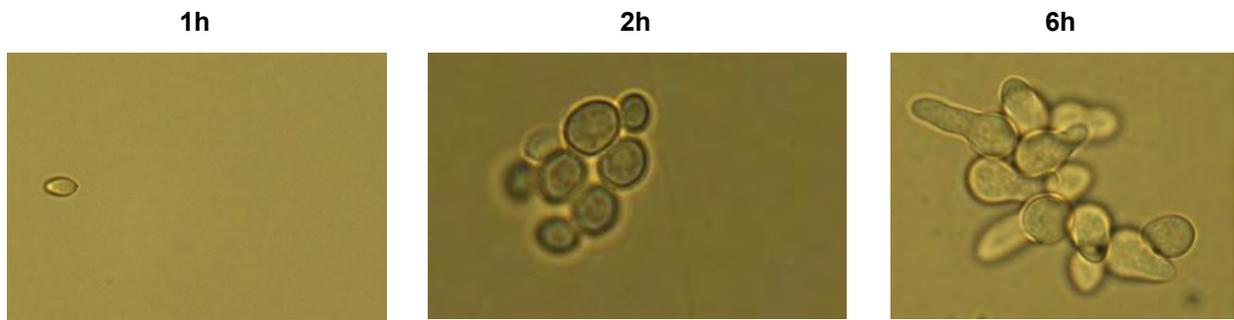


Fig. 30 Germinación de *T. spectabilis* HCS12 en cultivo sumergido

10.7.1 Lisis de esporas

Se adiciono 1 mg de enzimas líticas/mL cultivo. Las enzimas en este experimentos se adicionaron a la hora número 4 de incubación y se tomo una muestra de 400 μ l cada 10 minutos, fue centrifugada y lavada con agua, luego se resuspendio en agua y se tiño con 50 μ l de azul de algodón

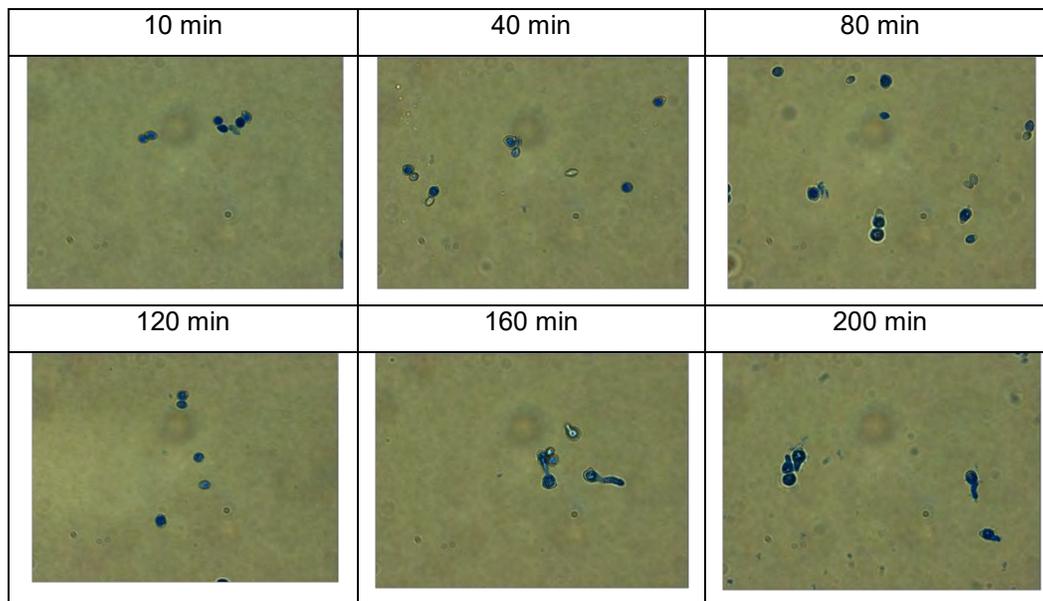


Fig. 30 Efecto de enzimas líticas sobre esporas germinadas de *T. spectabilis* HCS12

10.8 Construcción del vector de expresión de *vpl*.

Los plásmidos pGMGavm, pALMP2, pJPPE y pJBar fueron replicados en *E. coli* DH5 α y purificados mediante el método de Zhou C. y col., 1990

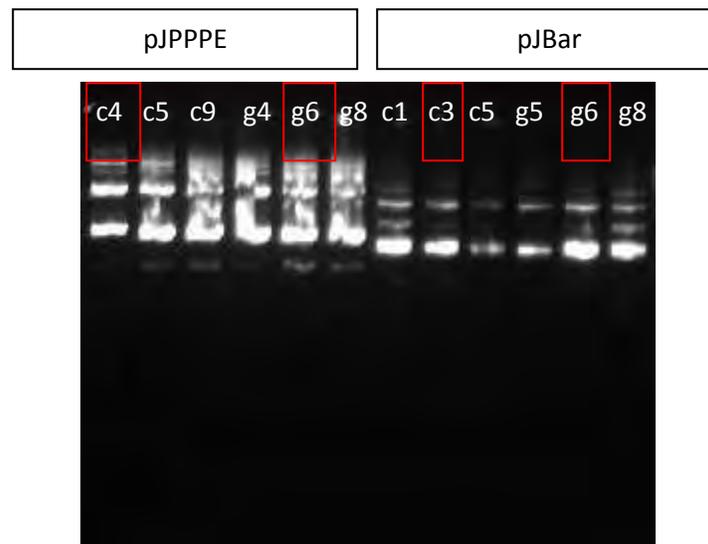


Fig. 31

Volumen final de dilución: 100 μ l. Muestra de análisis: 2 μ l de cada miniprep.

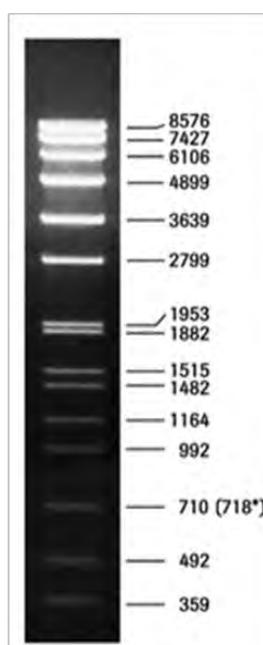
Las clonas c4 y g6 de pJPPPE así como las clonas c3 y g6 de pJBar fueron seleccionadas para un análisis de restricción. Para ello fueron cultivadas en 10 mL de medio Luria Bertani con 100 μ g/mL de ampicilina durante 12 hr y posteriormente centrifugadas para extraer DNA plasmídico con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega A1460 el cual tiene una eficiencia de 3.5-5 μ g de plásmido de alto número de copias y de 1.5-3.0 μ g para plásmidos de bajo número de copias. La mínima recuperación esperada es de 3.5 5 μ g de plásmido ya que los plásmidos con que se cuenta tienen un origen de replicación pMB1 de alto número de copias (500-700).

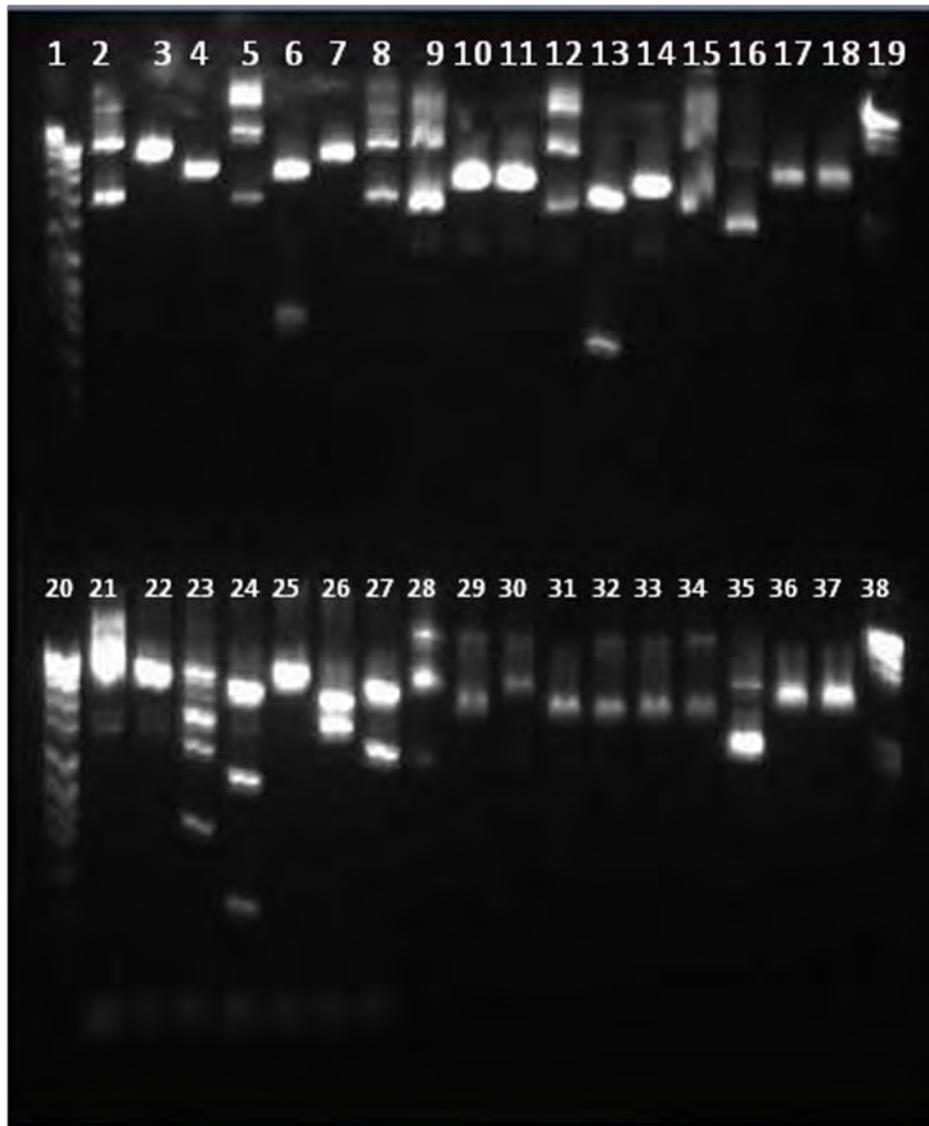
Las enzimas que se utilizaron para analizar las clonas del plásmido pJPPPE fueron HindIII, NdeI, EcoRV, BamHI, PstI y ApaI. HindIII debería linearizar el plásmido, la reacción con NdeI no debería cortar si es que la construcción fue hecha en pJet, la digestión con EcoRV rinde 2 fragmentos; uno de 2720 que corresponde al caset de *cbx* y otro de 2996 correspondiente a pJet. BamHI corta justo en extremo 3' de *cbx* y dentro del promotor *Pika*. La enzima que se usó para cortar justo en *cbx* fue PstI pero que también corta en pJet produciendo 2 fragmentos uno de 1636 y 4080. Finalmente la digestión con ApaI produjo un solo corte en *Pika* rindiendo así la linearización

de pJPPPE. Las clonas de pJBar se analizaron con PstI que debería linearizar el plásmido y con Apal que corta en el gen de interés *bar*. Las digestiones de cada una de las enzimas anteriores sobre los plásmidos pJMGP y pBluescript KS, se utilizaron como controles. La ubicación de cada digestión en el gel de electroforesis se muestra en la siguiente tabla, el bandeo del marcador utilizado y posteriormente el electroferograma obtenido.

Carril	Digestión	Carril	Digestión	Carril	Digestión	Carril	Digestión
1	Roche VII	11	NdeI	21	pJMGP	31	EcoRV
2	pJPPE c4	12	EcoRV	22	HindIII	32	BamHI
3	HindIII	13	BamHI	23	NdeI	33	PstI
4	NdeI	14	PstI	24	EcoRV	34	Apal
5	EcoRV	15	Apal	25	BamHI	35	pJBar g6
6	BamHI	16	pJBar c3	26	PstI	36	PstI
7	PstI	17	PstI	27	Apal	37	Apal
8	Apal	18	Apal	28	pB KS	38	λ HindIII/EcoRI
9	pJPPPE g6	19	λ HindIII/EcoRI	29	HindII	39	
10	HindIII	20	Roche VII	30	NdeI	40	

2 μ l de Marcador molecular VII Roche [0.25 μ g/ μ l]. Las seis primeras bandas tienen un porcentaje del 19.4, 16.85, 13.85, 11.11, 8.25 % (en promedio 55 ng DNA), cuyo patrón de bandeo se muestra en la siguiente figura.





Las clona c3 y g6 del plásmido pJBar mostraron el mismo bandeo en el análisis de restricción, pero la clona g6 es la que se usó como templado para la amplificación del gen *bar*. Mientras que para la obtención del promotor *pika* por restricción se seleccionó la clona c4 del plásmido pJPPPE.

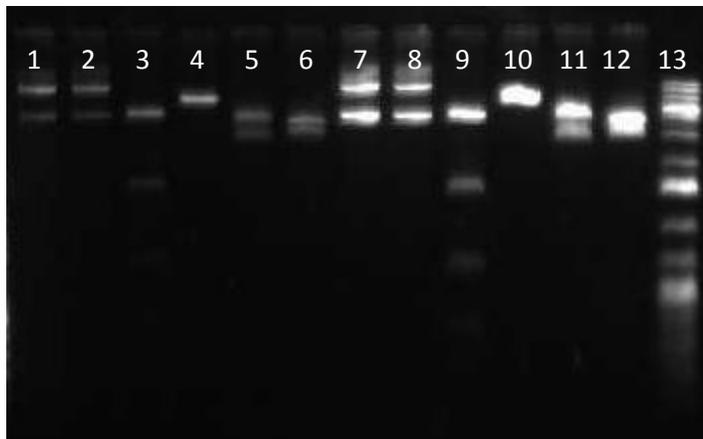
El plásmido pGMGavm y pALMP2 fueron replicados en *E. coli* DH5 α . El dna plásmidico de 6 clonas de cada uno se obtuvo por el método de Zhou C. y col., 1990



Las clonas c9 y g3 del plásmido pGMGavm así como las clonas c2 y g6 del plásmido pALMP2 se cultivaron en 10 ml de LB con 100 μ g/mL de ampicilina durante 12-16 hr. Al cabo de ese tiempo las células fueron centrifugadas y el DNA plásmidico se purifico por kit para ser analizados por restricción.

Las enzimas EcoRI, XhoI, XbaI, ApaI y BamHI se usaron para analizar el plásmido pGMGavm. Los resultados esperados por la digestión de EcoRI, de acuerdo a la secuencia proporcionada, es que no debe haber digestión. La obtención de cinco fragmentos de tamaño de 3673, 1661, 691, 381 y 240 bp por la digestión con XhoI se debe a que hay 1 sitio de reconocimiento en el vector, dos sitios de reconocimiento en el gen *mnp1* y dos sitios de reconocimiento para esta enzima en el promotor *gpdA*. La digestión con XbaI debe dar la linearización del plásmido de 6646 bp así como la digestión por ApaI la cual corta en *mnp1*. Finalmente la digestión por BamHI debe producir la escisión del caset de expresión de 3666 pb y el fragmento correspondiente al vector en que fue clonado de 2980 pb.

pGMGavm



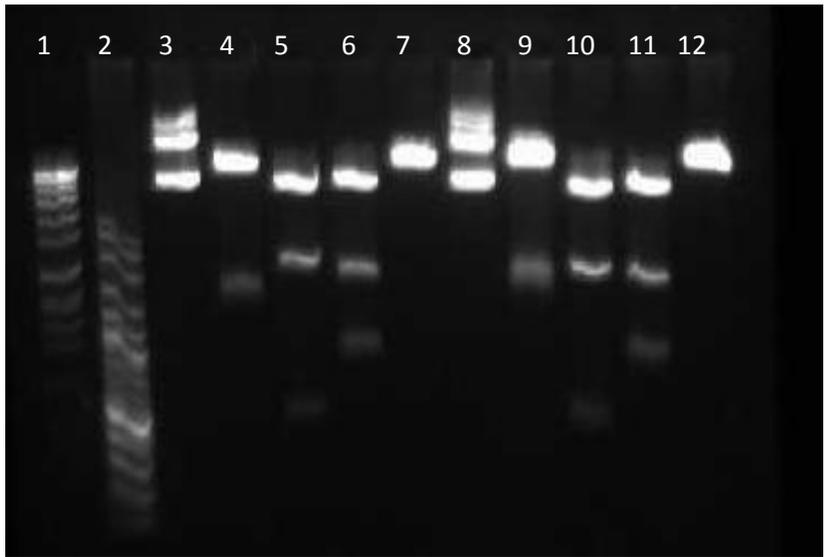
- | | | | |
|---|----------|----|-------------------------------|
| 1 | Clona c9 | 7 | Clona g3 |
| 2 | EcoRI | 8 | EcoRI |
| 3 | XhoI | 9 | XhoI |
| 4 | XbaI | 10 | XbaI |
| 5 | ApaI | 11 | ApaI |
| 6 | BamHI | 12 | BamHI |
| | | 13 | Marcador Fermentas #SM1338 MM |

La clona de pGMGavm g3 se utilizo como templado para los productos de PCR pGG y PCR *gpdA*-PS.

El plásmido pALMP2 en sus clonas c2 y g6 también fueron analizadas pero con HindIII, XbaI, NcoI y EcoRV. La enzima HindIII encuentra dos sitios de reconocimiento en *argB*⁺ (ornitina carbamoiltransferasa) produciendo 2

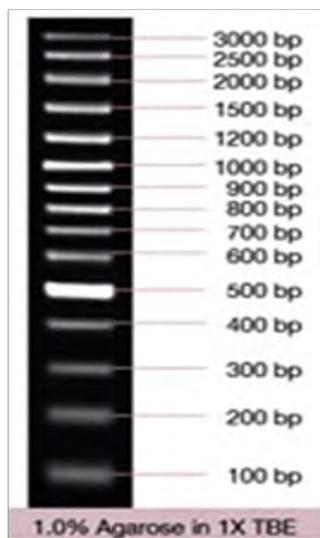
fragmentos; uno de 1453 bp y otro de 6170 bp. Por otra parte, el promotor *alcA* de 630 bp se libera mediante la digestión con XbaI. El gen *vpI2* tiene un sitio de reconocimiento para NcoI, pero no se sabe si en el resto del plásmido hay más sitios de reconocimiento para esta enzima. Por último EcoRV debe producir la linearización del plásmido.

pALMP2

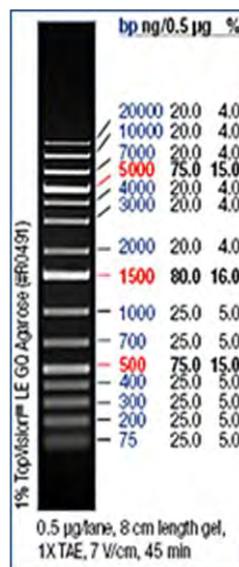


1	Roche	7	EcoRV
			VII
2	Vivantis	8	pALMP2
	VC100		g6
3	pALMP2	9	HindIII
			c2
4	HindIII	10	XbaI
5	XbaI	11	NcoI
6	NcoI	12	EcoRV

El patrón de bandeo de los marcadores de peso molecular Vivantis VC100 y Fermentas SM1338 se muestran a continuación.

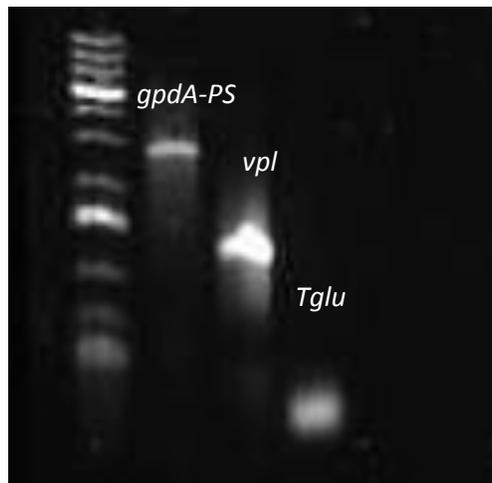


Vivantis VC100



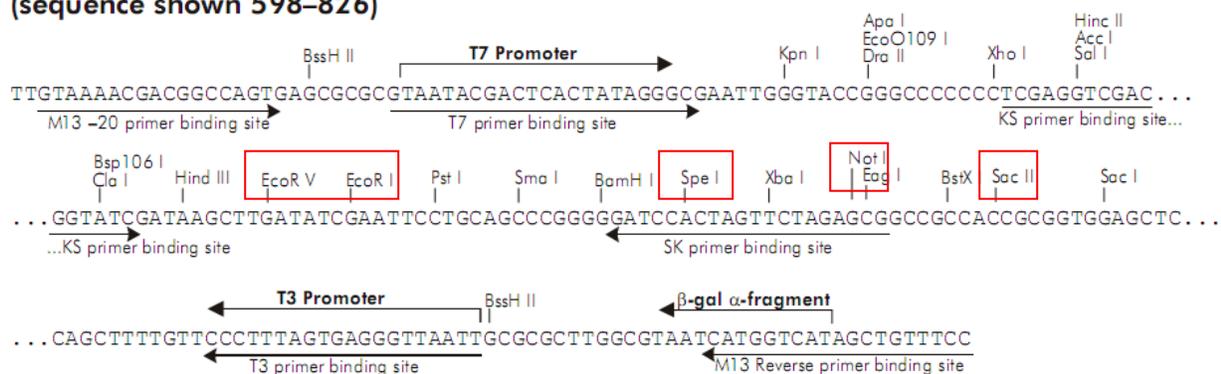
Los primeros productos de PCR obtenidos fueron el tándem promotor *gpdA*-péptido señal con los sitios de restricción para SacII e HindIII en el extremo 5' y el sitio de reconocimiento para NotI en el extremo 3' del

péptido señal con un tamaño de 2390 pb (*SacIIHindIII*P*gpdAPS*NotI) a partir del plásmido pGMGavm como templado. El gen que codifica para la peroxidasa versátil proveniente de *Pleurotus ostreatus* se amplificó con los sitios de restricción para NotI en el extremo 5' y el sitio SpeI en el extremo 3' con un tamaño de 1013 pb (NotI*vp*/SpeI) a partir del plásmido pALMP2 como templado. El terminador de la glucoamilasa de 130 pb se amplificó, a partir del plásmido pGMGavm como templado, con los sitios de restricción para SpeI en el extremo 5' y los sitios EcoRV y EcoRI en el extremo 3' (SpeI*Tglu*EcoRIEcoRV). Cada producto de PCR fue clonado en el vector de clonación para productos de PCR pSC-A-amp/Kan. Los plásmidos construidos con estos productos de PCR se nombraron pSC*gpdA-PS*, pSC*vpI*NotI y pSCT*glu*.



Los productos de PCR *SacIIHindIII*P*gpdAPS*NotI, NotI*vp*/SpeI y SpeI*Tglu*EcoRIEcoRV se clonaron en fase en el sitio de clonación múltiple de pBluescript KS en los sitios indicados.

pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



Las reacciones de ligación se llevaron a cabo siguiendo la regla general de que los plásmidos recombinantes circulares monoméricos pueden obtenerse cuando se ponen cantidades equimolares de plásmido y de inserto,

con una concentración <10 µg/mL (Bercovich y col., 1992). Si la proporción molar del vector en relación con el inserto es incorrecta, entonces la reacción de ligación puede generar un gran número de plásmidos vacíos o plásmidos con tándem de inserto. La proporción molar del inserto respecto al vector en la reacción de ligación no debería ser menor de 2:1 y no mayor de 4:1

$$\frac{(\text{ng de vector})(\text{kb del inserto})}{\text{Kb del vector}} \times \frac{(\text{proporción molar de inserto})}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

La clonación del producto de PCR *NotI*/*SpeI* en pBS-KS se hizo a partir de la digestión de ambos DNAs primero con *SpeI* de New England Biolabs, ya que su buffer contiene una concentración mas baja. Posteriormente se digirió con *NotI* de Promega. Las condiciones de digestión se detallan en la siguiente tabla.

Componente	Volumen	Componente	Volumen
NeBuffer2	1 µl	Buffer D	2 µl
pBS-KS [30 ng/µl]	0.5 µl	pBS-KS [15 ng]	10 µl
PCR <i>NotI</i> / <i>SpeI</i> [50 ng/µl]	0.5 µl	PCR <i>NotI</i> / <i>SpeI</i> [25 ng]	
<i>SpeI</i> [10U/ µl]	0.5 µl	<i>NotI</i>	0.5 µl
H ₂ O	7.5 µl	H ₂ O	7.5 µl
Digestión 37°C x 4hr Inactivación 80°C x 20 min		Digestión 37°C x 2hr Inactivación 65°C x 15 min	

Una vez inactivada la última enzima, la mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de ligación.

Componente	Volumen
DNA pBS-KS 15 ng	20 μ l
DNA <i>vpl</i> 25 ng	
10X Buffer	3 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l
H ₂ O	6 μ l

4-16°C x 1 noche

El protocolo de transformación consultado en Sambrook y Russell, recomienda usar un máximo de 25 ng o hasta el 10% del volumen total de las células competentes. En este caso se aplicaron 5 μ l de la reacción de ligación a 50 μ l de células competentes. Después de la transformación por choque térmico, las células se recuperaron durante 1 h en 900 mL de medio SOC. Posteriormente, las células fueron plaqueadas en medio LB-agar con ampicilina y se incubaron a 37°C por 12-16 hrs. Se obtuvieron colonias y 10 de ellas fueron aisladas y cultivadas en LB con ampicilina, centrifugadas y el DNA plasmídico extraído. Solo las clonas 2, 3 y 10 fueron seleccionadas por presentar un desplazamiento, diferente entre sí, en electroforesis. El DNA plasmídico de las clonas seleccionadas fueron analizadas mediante restricción con BamHI y SacII que debió liberar el inserto de 1013 pb, pero ninguna había integrado el inserto.

Las causas por las cuales se obtuvieron colonias es porque integraron el plasmido pBS-KS que es el que confiere la resistencia al antibiótico. Por lo tanto, es posible que no se haya llevado a cabo una digestión completa o que la cantidad de *vpl* no fue la necesaria para insertarse. Por lo tanto se implementó el protocolo siguiente.

La clonación de *vpl* en pBS-KS se trató de hacer pero ahora a partir de la digestión de pSCvplNotI con NotI y SpeI, cuya reacción fue separada por electroforesis y la banda correspondiente a la peroxidasa versátil fue cortada para luego extraerla del gel de agarosa mediante el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. En una reacción por separado, el vector pBS-KS también fue digerido con NotI y SpeI de Promega bajo las condiciones que se enlistan a continuación.

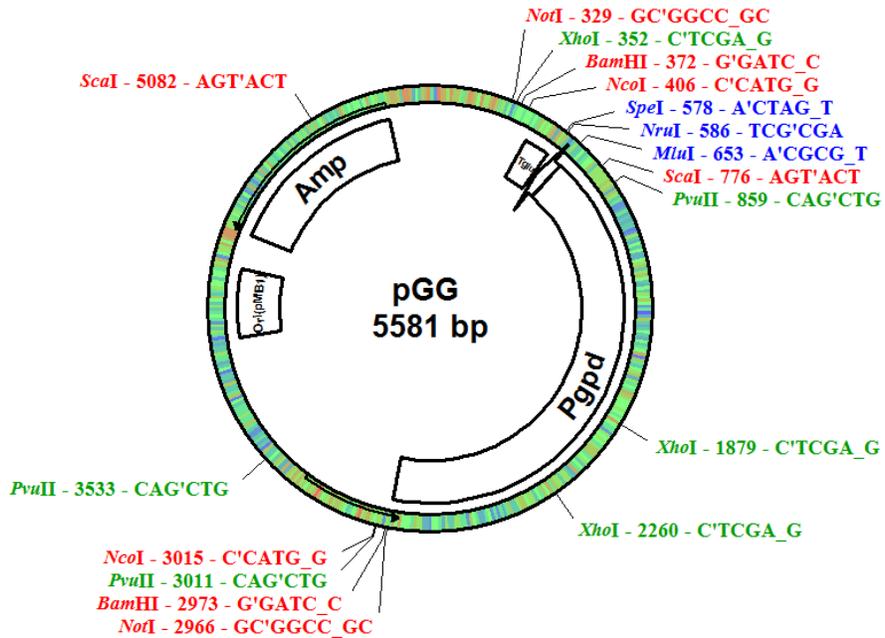
Digestión de pSCvplNotI		Digestión de pBS-KS	
Componente	Volumen	Componente	Volumen
BufferD	3 μ l	Buffer D	3 μ l
pSCvplNotI [35 ng/ μ l]	20 μ l	pBS-KS [35 ng/ μ l]	20 μ l
BSA	0.3 μ l	BSA	0.3 μ l
SpeI [10U/ μ l]	0.5 μ l	SpeI [10U/ μ l]	0.5 μ l
NotI [10U/ μ l]	0.5 μ l	NotI [10U/ μ l]	0.5 μ l
H ₂ O	5.7 μ l	H ₂ O	5.7 μ l
Digestión 37°C x 4hr Inactivación 65°C x 15 min		Digestión 37°C x 4hr Inactivación 65°C x 15 min	

El fragmento *vpI* obtenido a partir de la purificación del gel se eluyó en 50 μ l y solo 1 μ l se analizó por electroforesis. La concentración estimada de este fragmento fue de 2 ng/ μ l. El plasmido pBS-KS digerido con NotI y SpeI también se analizó por electroforesis, estimándose una concentración de 70 ng/ μ l. La proporción vector:inserto fue de 1:3 y las condiciones de ligación siguientes.

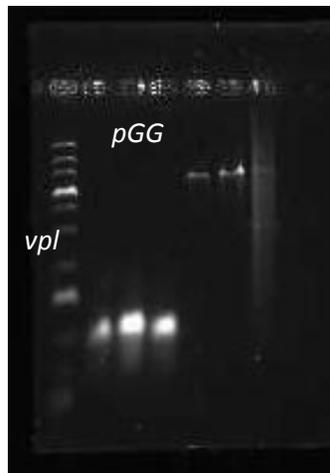
Componente	Volumen
DNA pBS-KS [70 ng/ μ l]	0.7 μ l
DNA <i>vpI</i> [2 ng/ μ l]	25 μ l
10X Buffer	3 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l

La transformación se llevo a cabo con 10 μ l de la reacción de ligación anterior. Se observaron colonias sobre placas con LB agar adicionado con ampicilina. Solo 10 colonias se cultivaron y su DNA plasmidico se analizara por restricción con las enzimas NotI y SpeI.

La construcción del caset de expresión de *vpl* se está siguiendo por dos estrategias. La segunda estrategia comprende la clonación de *vpl* pero en el producto de PCRpGG que corresponde a la amplificación de los elementos funcionales del plásmido pGMGavm a excepción del gen *mnp1*.



Para llevar a cabo la estrategia mencionada se obtuvieron los productos de PCR pGGNdeI, pGGNruI y pGGSnaBI que contienen sitios de restricción diferentes en el extremo 3' del péptido señal así como los productos de PCR vplNdeI, vplNruI y vplSnaBI.



La clonación de *vpINdel* y *pGGNdel* se trato de realizar directamente con los respectivos productos de PCR r digeridos en un solo tubo de reacción primero *SpeI* de Promega y luego con *Ndel* de Invitrogen.

Componente	Volumen	Componente	Volumen
Buffer B	1 μ l	React 6	2 μ l
<i>pGGNdel</i> [4 ng/ μ l]	1 μ l	<i>pGGNdel</i> [4 ng]	
<i>vpINdel</i> [3 ng/ μ l]	7.26 μ l	<i>vpINdel</i> [0.7274 ng]	10 μ l
BSA	0.1 μ l	BSA	-----
<i>SpeI</i> [10U/ μ l]	0.5 μ l	<i>Ndel</i>	0.5 μ l
H ₂ O	0.14 μ l	H ₂ O	7.5 μ l
Digestión 37°C x 4hr Inactivación 65°C x 15 min		Digestión 37°C x 4hr Inactivación 65°C x 15 min	

El volumen total de la última digestión se utilizo para la ligación puesto que contenía el DNA del inserto y del vector.

Componente	Volumen
DNA 4.72 ng	20 μ l
10X Buffer	3 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l
H ₂ O	6 μ l

La transformación de las células competentes se llevo a cabo con solo 10 μ l de la reacción de ligación anterior, pero después de plaquear e incubar a 37°C por 16 h ninguna colonia se observó. El mismo procedimiento se utilizará para la ligación de *pGGNrul* y de *pGGSnaBI* con *vpINrul* y *vpISnaBI*, respectivamente, pero aumentando a 100 ng la cantidad total de ADN en la reacción de ligación.

La construcción del caset de resistencia a glufocinato se inicio con la digestión de *pJPPPE* con *NcoI* de Invitrogen bajo las siguientes condiciones.

Componente	Volumen
React 3	1 μ l
pJPPPE [100 ng/ μ l]	1.5 μ l
NcoI	0.5 μ l
H ₂ O	7 μ l

Digestión 37°C por 2h
Inactivación 70°C por 15 min

Después de la inactivación de NcoI, la mezcla fue adicionada con 1 μ l de fosfatasa e incubada por 5 minutos, al cabo del cual fue inactivada a 65°C x 15 min. El total de esta mezcla se sometió a separación por electroforesis donde se observaron 2 bandas correspondientes a 890 pb y 4854 pb. La banda de mayor tamaño fue recuperada a partir del gel de agarosa pues contiene los elementos de interés como el promotor *pki* y el terminador *trpC*. El producto de PCR *bar* también se sometió a digestión con NcoI. La reacción de ligación para estos dos fragmentos se ajusto como sigue.

Componente	Volumen
DNA <i>pika-trpC</i> [0.6 ng/ μ l]	10 μ l
DNA <i>bar</i> [1 ng/ μ l]	2 μ l
10X Buffer	3 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l
H ₂ O	14 μ l

La transformación se llevo a cabo con 10 μ l de la reacción de ligación anterior. Solo se observó una colonia resistente a ampicilina la cual fue analizada mediante la digestión con NcoI y la doble digestión con Apal/SmaI. La primera para comprobar la inserción de *bar* y la segunda digestión para comprobar la correcta dirección en que se haya clonado el gen. La clona obtenida no contiene el inserto deseado.

La clonación de *bar* en *pika-trpC* también se intento pero a partir de la digestión con NcoI de pSCbar y el mismo protocolo de obtención del promotor y terminador a partir de pJPPPE bajo las siguientes condiciones.

Componente	Volumen	Componente	Volumen
Buffer	3 μ l	Buffer	2 μ l
pSCbar [35 ng/ μ l]	20	pJPPPE [35 ng/ μ l]	15
NcoI [10U/ μ l]	0.5 μ l	NcoI [10U/ μ l]	0.5 μ l
H ₂ O	6.5 μ l	H ₂ O	2.5 μ l
Digestión 37°C x 4hr Inactivación 65°C x 15 min		Digestión 37°C x 4hr Inactivación 65°C x 15 min	

Una vez digeridos los plásmidos pSCbar y pJPPPE con NcoI, los fragmentos generados se separaron por electroforesis en agarosa y las bandas de 560 y 4854 pb fueron extraídas del gel para someterlas a ligación.

Componente	Volumen
DNA <i>pika-trpC</i> [4 ng/ μ l]	18 μ l
DNA <i>bar</i> [3 ng/ μ l]	8.33 μ l
10X Buffer	3 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l
H ₂ O	14 μ l

De la reacción de ligación se tomaron 10 μ l para transformar 50 μ l de células competentes. Las colonias crecidas sobre LB con ampicilina se cultivaron en líquido para extraer DNA plasmídico y se analizaran con NcoI y con ApaI/SmaI para asegurar la inclusión del inserto así como la dirección en que se haya clonado.

10.9 Evaluación de transformantes

Los métodos de biobalística y electroporación rindieron colonias con la capacidad de degradar el antifúngico carboxina. La eficiencia de transformación del método de electroporación fue de 80 colonias por microgramo de ADN mientras que la eficiencia del método de biobalística fue de 10 colonias transformadas por microgramo de ADN. Los cultivos monosporicos de solo 5 colonias de cada cepa obtenida por los diferentes métodos de transformación fueron sometidas a 5 pases consecutivos de desafío frente al antifúngico. Todas las colonias mantuvieron su resistencia a carboxina.

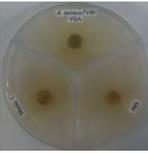
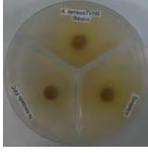
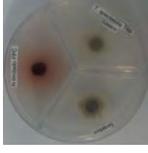
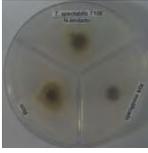
La selección de las cepas transformantes se realizó en base a su capacidad de decoloración de O-anizidina y RBlack5. Partiendo del conocimiento que las cepas silvestres de *A. terreus* y *T. spectabilis* no poseían un sistema enzimático capaz de oxidar ninguno de estos dos colorantes.

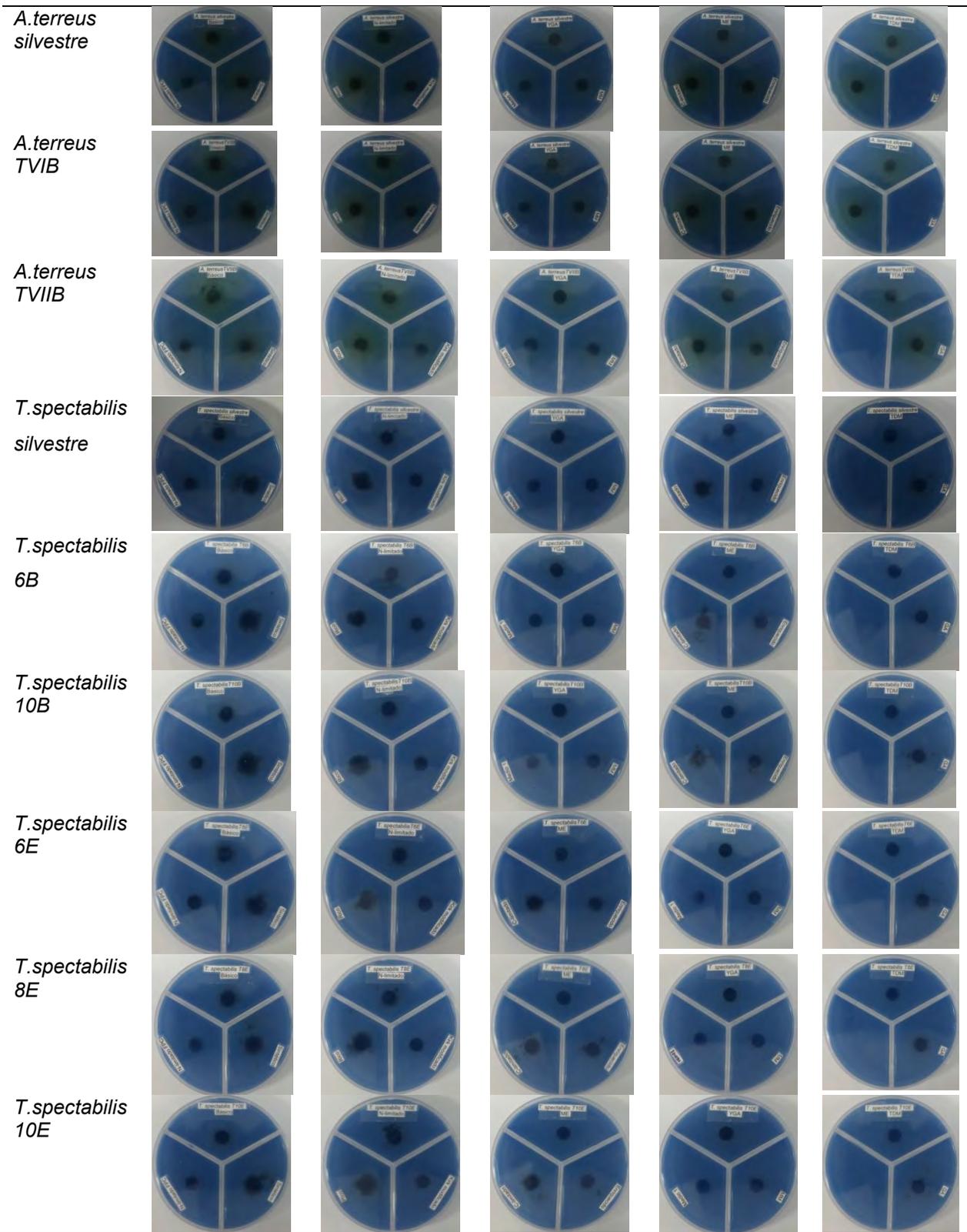
10.9.1 Sondeo de la expresión heteróloga de *vpl* en *A. terreus* y *T. spectabilis* por decoloración de O-anizidina y RBlack5 en cultivo superficial.

La oxidación de O-anizidina visible por la producción de un halo púrpura permitió identificar las cepas que producen eficientemente *vpl*, la enzima heteróloga. Solo las cepas transformadas de *T. spectabilis* mostraron la capacidad de oxidar O-anizidina.

Se puede observar en la figura que de las cepas obtenidas por electroporación es la transformante 8E la que presenta un halo púrpura más amplio e intenso. Sin embargo es necesario cuantificar la actividad catalítica para seleccionar la cepa con la mayor capacidad de expresión heteróloga.

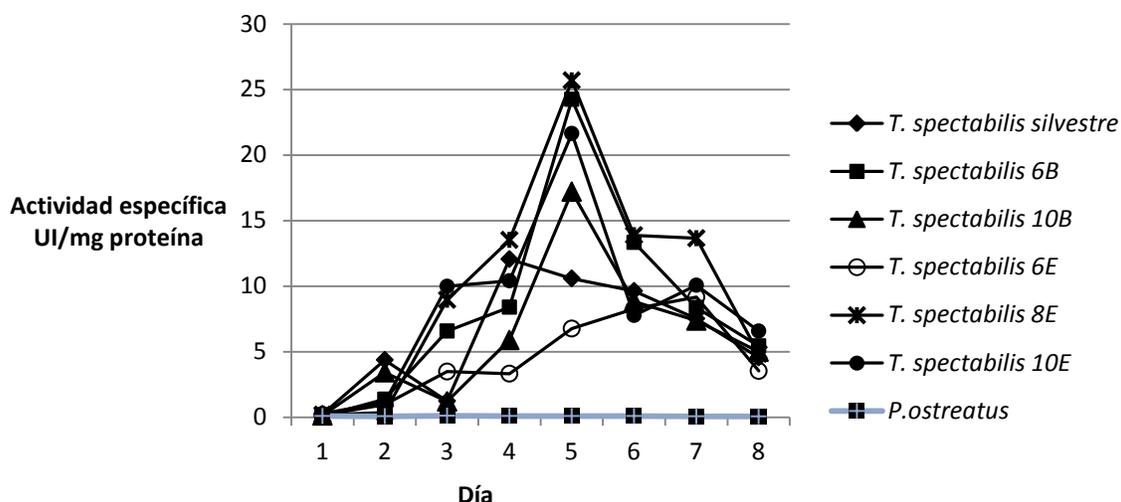
Por el contrario no se obtuvo un resultado positivo al poner en contacto cada una de las cepas transformantes con el colorante RBlack5 bajo las condiciones usadas.

<i>A.terreus</i> <i>silvestre</i>					
<i>A.terreus</i> <i>TVIB</i>					
<i>A.terreus</i> <i>TVIIB</i>					
<i>T.spectabilis</i> <i>silvestre</i>					
<i>T.spectabilis</i> <i>6B</i>					
<i>T.spectabilis</i> <i>10B</i>					
<i>T.spectabilis</i> <i>6E</i>					
<i>T.spectabilis</i> <i>8E</i>					
<i>T.spectabilis</i> <i>10E</i>					



10.9.2 Cuantificación de la expresión heteróloga de *vpl* en *T. spectabilis* en cultivo sumergido.

La cepa con mayor actividad catalítica fue *T. spectabilis* 8E con 25 U por mg de proteína, esta cepa fue obtenida por el método de electroporación.



11. Conclusiones

Se logró aislar 37 cepas fúngicas de un suelo contaminado con hidrocarburos, las cuales fueron identificadas en género y especie.

La selección primaria arrojó 13 cepas fúngicas con diferentes niveles de tolerancia a PAHs, entre las que destacaron cuatro. Estas cepas fueron designadas como *Talaromyces spectabilis* HCS12, *Aspergillus terreus* HCS2B, *Scedosporium apiospermum* HCS17 y *Fusarium verticillioides* HCS5A, cuyas Vcr en presencia de 1000 ppm fueron de 1.16 ± 0.014 , 0.539 ± 0.018 , 0.5 ± 0.007 y 0.484 ± 0.0007 cm día⁻¹.

La remoción de pireno estuvo encabezada por *Talaromyces spectabilis* HCS12, cuyo porcentaje de remoción fue de 20%. Mientras que *Aspergillus terreus* HCS2B removió un 17% y finalmente *Fusarium verticillioides* HCS5A removió el 15% del pireno inicial en un lapso de 14 días.

La remoción de fenantreno sin embargo presentó mayor fluctuación, presentándose rangos de remoción para este contaminante desde 19 hasta 26 % por *F. verticillioides* SCO5A, mientras que el rango de remoción por A.

terreus SCO2B fue de 22-25 %. Un rango de 17-27 % en la remoción del fenantreno por *T. spectabilis* SCO12 fue observado.

Las cepas candidatas a la expresión heteróloga del gen *vpl2* fueron seleccionadas por su tolerancia a 1000 ppm PAHs cuantificada por su velocidad de crecimiento radial (Vcr) así como por mantener su fenotipo aun en presencia de tales contaminantes. Las cepas seleccionadas son *T. spectabilis* SCO12 y *A. terreus* SCO2B.

A. terreus SCO2B se inhibió completamente en presencia de carboxina, glufocinato y bleomicina en concentraciones de 1000, 800 y 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Las concentraciones que inhibieron completamente el crecimiento de *T. spectabilis* SCO12 fueron 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de carboxina, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de glufocinato y 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bleomicina. Sin embargo esta cepa no mostro inhibición por higromicina en concentraciones de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

La transformación de *A. terreus* SCO2B se vio favorecida por el empleo de esporas germinadas. La resistencia al fungicida carboxina comprueba que esta cepa reconoce al promotor de piruvato cinasa Ppki proveniente de *A. niger*. El fenotipo de la cepa transformante no difiere de la nativa y la eficiencia de transformación alcanzada fue de al menos 11 transformantes por $\mu\text{g DNA}$.

Se logro la construcción del vector de expresión para *vpl*, bajo el promotor constitutivo de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y el péptido señal de la glucoamilasa.

La transformación de *A. terreus* y *T. spectabilis* se obtuvo tanto por los métodos de electroporación y biobalística.

La cepa *T. spectabilis* 8E obtenida por electroporación expresa eficientemente la enzima heterologa.

12. Referencias Bibliográficas

Abalos, A., Viñas M., Sabaté J., Manresa M. A., y Solanas A. M. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15:249–260.

Alic, M., Letzring C., y Gold M. H. (1987). Mating system and basidiospore formation in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1464-1469.

Alic, M., y Gold M. H. (1991). Genetics and molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In J. W. Bennett and L. L. Lasure (ed.), *More gene manipulations in fungi*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif., p. 319-341.

Alic Margaret y Gold Michael H. (1993) *Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, p. 605-622

Amann, R. I., Ludwig W., y Schleifer K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169.

Amaral PF, Fernandes DL, Travares AP, Xavier AB, Cammarota MC, Coutinho JA, Coelho MA (2004) Decolorization of dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*. *Environ Technol* 25:1313–1320

Anastasi Antonella, Coppola Tiziana, Prigione Valeria, Varese Giovanna C. (2009) Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials* 165:1229-1233

Andrawis, A., Pease E. A., y Tien M. (1990). In T. K. Kirk and H.-M. Chang(ed.), *Biotechnology in pulp and paper manufacture*. Butterworth-Heinemann, Boston. Extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and expression, p. 601-613.

Andreoni, V., Cavalca L., Rao M. A., Nocerino G., Bernasconi S., Dell'Amico E., Colombo M., y Gianfreda L.. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57:401–412.

Annibale A. D', Rosetto F., Leonardi V., Federici F., y Petruccioli M. (2006). Role of *Autochthonous Filamentous Fungi* in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons Applied and Environmental Microbiology, p. 28–36.

Anyakora Chimezie, Ogbeche Anthony, Palmer Pete, Coker Herbert, Ukpo Grace and Ogah Celina (2005) GC/MS analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in sediment samples from the Niger Delta region. *Chemosphere* 60:990-997.

Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

Asada, Y., Watanabe A., Irie T., Nakayama T., y Kuwahara M. (1995). Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1251:205–209.

ATSDR (Agency of toxic substances and disease registry). (1997) Priority list of hazardous substances.

Atlas RM: (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Review*, 45:180-209

Ayed, L., Assas N., Sayadi S., y Hamdi M. (2004). Involvement of lignin peroxidase in the decolorization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:7–11.

Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32:78–91.

Barcellos, F. G. ; Fungaro, M. H. P. ; Furtlaneto, M. C. ; Lejeune, B. ; Pizzirani Kleiner, A. A. ; Azevedo, J. L. . (1998) Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* unstable transformants obtained by biolistic process. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 44, n. 12, p. 1137-1141,.

Bar-Lev, S. S., y Kirk T. K. (1981). Effects of molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:373–378.

Bartolomé L., Cortazar E., Raposo J.C., Usobiaga A., Zuloaga O., Etxebarria N., Fernández L. A. (2005) Simultaneous microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalate esters and nonylphenols in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1068:229-236.

Beijersbergen A., Den Dulk-Ras A., Schilperoort R.A. y Hooykaas P.J.J (1992). Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 256:1324-1327.

Belinky, P. A., Flikshtein N., y Dosoretz C.G. (2006). Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 39:222–228.

- Belinky, P. A., Flikshtein N., Lechenko S., Gepstein S., y Dosoretz C. G. (2003). Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6500–6506.
- Benavides J., Quintero G., Guevara A. Jaimes D., Gutiérrez S., Miranda Johanna (2006) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA.* 4 (5):82-90.
- Bennett J.W. and Lasure L.L. (1991). Growth media, pp 441-458, in *More gene manipulations in fungi*, Bennett, J.W. y Lasure L.L. (eds.). Academic Press, San Diego, CA.
- Bennett y Lasure L. L. (ed.), *More gene manipulation in fungi*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Berset J. D., M. Ejem, R. Holzer, and P. Lischer (1999) Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*, vol. 383, no. 3, pp. 263–275.
- Bezalel, L., Hadar, Y. & Cerniglia, C. (1996) Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 292-295.
- Black, A. K., y Reddy C. A. (1991). Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 428-435.
- Blumer, M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* 234: 34-45.
- Bonnarme, P., y Jeffries T. W. (1990). Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:210-217.
- Boyle CD (1995) Development of a practical method for inducing white rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. *Can. J. Microbiol.* 41: 345–353
- Bogan, B.W., Lamar, R.T. & Hammel, K.E. (1996) Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1788-1792.
- Bogan BW, Lamar RT (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon- degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol* 62:1597–1603.
- Bogan, B. W., Schoenike B., Lamar R. T., y Cullen D. (1996). Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2381–2386.
- Boominathan, K., Dass S. B., Randall T. A., y Reddy C. A. (1990). Nitrogen-deregulated mutants of *Phanerochaete chrysosporium*-a lignin-degrading basidiomycete. *Arch. Microbiol.* 153:521-527.
- Boominathan, K., Dass S. B., Randall T. A., Kelley R. L., y Reddy C. A. (1990). Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 172:260-265.
- Boominathan, K., y Reddy C. A. (1992). cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5586-5590.
- Bouchez, T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Dore J., Delegenes P., Moletta R., y Wagner M. (2000). Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* 2:179–190.
- Bourbonnais, R., y Paice M. G. (1988). Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* 255:445-450.

Broekhuijsen, M. P., Mattern I. E., Contreras R., Kinghorn J. R., y Van den Hondel C. A. M. J. J. (1993). Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J. Biotechnol.* 31:135–145.

Brown A. H. y Smith G. (1957). The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssosclamyces* Westling. *Trans Br Mycol Soc* 40, 17-89.

Brown, J. A., Glenn J. K., y Gold M. H. (1990). Manganese regulates the expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 172:3125-3130.

Brown, J. A., Alic M., y Gold M. H. (1991). Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J. Bacteriol.* 173:4101-4106.

Brown, J. A., Dan L., Alic M., y Gold M. H., Unpublished results

Brown JS, Aufauvre-Brown A, Holden DW (1998) Insertional mutagenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Gen Genet* 259:327– 335

Buco S., Moragues M., Doumenq P., Noor A., Mille G., (2004) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by Curie point pyrolysis coupled to gas chromatography-mass spectrometry, an alternative to conventional methods. *Journal of Chromatography A*, 1026. 223-229.

Bumpus, J.A., Tien, N.I., Wright, D. & Aust, S.D. (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228, 1434±1436.

Bumpus, JA., y Aust S. D. (1987). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Bioessays* 6:166-170.

Bumpus JA (1989) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 154–158

Bundock P, Dulk-Ras A den, Beijersbergen A, Hooykaas PJ (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 3:3206–3214

Bundock P. y Hooykaas P.J.J. (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 93:15272-15275.

Buswell, J. A., Mollet B., y Odier E. (1984). Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 25:295-299.

Camarero S, Böckle B, Martínez MJ, Martínez AT (1996) Manganese mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Environ Microbiol* 62:1070–1072

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT (1999) Description of a versatile peroxidase in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem* 274:10324–10330

Camarero Susana, Sarkar Sovan, Ruiz-Dueñas Francisco Javier, Martínez María Jesús, y Martínez Ángel T. (1999) Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin That Has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 10324–10330.

Canet R, Birnstingl JG, Malcom DG, Lopez-Real JM & Beck AJ (2001) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combination of white rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Biores. Technol.* 76: 113–117.

Capotorti Guido, Paolo Digianvincenzo, Pietro Cesti, Antonella Bernardi & Gianfranco Guglielmetti. (2004). Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil *Biodegradation* 15: 79–85,.

Cardoza, R. E., Moralejo F. J., Gutierrez S., Casqueiro J., Fierro F., y Martin J. F. (1998). Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADPdependent glutamate dehydrogenase. *Curr. Genet.* 34:50–59.

Cases I, de Lorenzo V. (2005) Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *IntMicrobiol*;8:213–22.

Cerniglia CE (1981) Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria fungi and algae. In: Hodgson E, Bend JR & Philpot RM (Eds) *Reviews in Biochemical Toxicology*, Vol 3 (pp 321–361). Elsevier/North Holland, New York

Cerniglia C.E.; White G.L.; Helflich R.H. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Microbiol.*, 143, 105-110.

Cerniglia, C. E. (1997), *J. Ind. Microbiol.* 19, 324–333.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

Chandrasekar P. H. y Sobel J.D. (2006). Micafungin: A new echinocandin. *Reviews of anti-infective agents* 42: 1171-1178.

Chavez Barreto Cristine, Cardoso Alves Luciano, Lima Aragao Francisco José, Rech Elíbio, Schrank Augusto, Henning Vainstein Marilene. (1997) High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *FEMS Microbiology Letters* 156:95-99.

Chee K. K., Wong M. K., Lee H. K. (1997) Microwave-Assisted Solvent Extraction of Air Particulates for the Determination of PAHs. *Environmental Monitoring and Assessment* 44:391-403.

Cho YG, Rhee SK, Lee ST: (2000) Effect of soil moisture on bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. *Biotechnol Letters*, 22(11):915-919.

Clar E., (1964) *Polycyclic Hydrocarbons*, Academic Press,.

Cohen, R., Yarden O., y Hadar Y. (2001). Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn^{2-} . *Environ. Microbiol.* 3:312–322.

Cohen Roni, Oded Yarden, y Yitzhak Hadar. (2002) Lignocellulose Affects Mn^{2-} Regulation of Peroxidase Transcript Levels in Solid-State Cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 3156–3158

Cohen, R., Persky L., y Hadar Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:582–594.

Cohen R, Persky L, Hazan-Eitan Z, Yarden O, Hadar Y (2002) Mn^{2+} alters peroxidase profiles and lignin degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* under different nutritional and growth conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 102–103:415–429

- Cohen Roni, Yarden Oded, y Hadar Yitzhak (2002). Lignocellulose Affects Mn²⁺ Regulation of Peroxidase Transcript Levels in Solid-State Cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3156–3158
- Cookson JT: (1995) *Bioremediation Engineering: Design and Application* McGraw-Hill, New York, USA.
- Cove DJ (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 113:51–56
- Crawford, R. L. (1981). Lignin biodegradation and transformation John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Culotta, V. C., y Hamer D. H. (1989). Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol. Cell. Biol.* 9:1376-1380.
- Curir, P., Mercuri, A., D'Aquila, F., Pasini, C., Dolci, M. (1997). Polyphenol oxidase in *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*: partial characterization and activity. *Cereal Res. Commun.* 25:835–839.
- Currah R. S. (1985). Taxonomy of the Onygenales: Athrodermataceae, Gymnoascaceae, Mysotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon* 24, 1-216.
- Dashtban Mehdi, Schraft Heidi, Qin Wensheng (2009) Review Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives *International Journal of Biological Sciences*; 5(6):578-595
- D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F., y Petruccioli M. (2006) Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *AEM*. 72 (1):28-36.
- De Block, M. (1993). The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. *Euphitica* 71:1-14.
- Dean J. R. and G. Xiong (2000) Extraction of organic pollutants from environmental matrices: election of extraction technique. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 19, no. 9, pp. 553–564.
- Dean-Ross, D., Moody, J., Cerniglia, C.E. (2002). Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:1–7.
- Den Dulk-Ras A, Hooykaas PJJ (1995) Electroporation of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Nickoloff JA (ed) Plant cell electroporation and electrofusion protocols. (Methods in molecular biology, vol 55) Humana Press, Totowa, N.J pp 63–73
- Dix, N.J., Webster, J. (1995). Fungal Ecology. Chapman and Hall, London, England.
- Doddapaneni Harshavardhan, Chakraborty Ranajit y Yadav Jagjit S (2005). Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : Evidence for gene duplications and extensive gene clustering *BMC Genomics*, 6:92
- Dolphin D, Forman A, Borg DC, Fajer J, Felton RH. (1991) Compounds I of catalase and horseradish peroxidase: π-cation radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:614–618. [PubMed: 5276770]
- Domenech Jezabel, Barasoain Isabel y Prieto Alicia. (1996). An antigenic water-soluble glucogalactomannan extracted from cell walls of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology* 142: 3497-3503.
- Domenech Jezabel, Prieto Alicia, Barasoain Isabel, Gómez-Miranda Begoña, Bernabé manuel y Leal J. Antonio. (1999). Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. *Microbiology*. 145:2789-2796.

Dunford, HB. (1991) Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. Everse, J.; Everse, KE.; Grisham, MB., editors. Boca Raton: CRC Press;. p. 1-24.

Durán, N., y Esposito E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B* 28:83–89.

Duo-Chuan L. I., Chen Shu y Jing L.U. (2005). Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* 159: 223-229.

Eibes Gemma, Cajthaml Tomas, Moreira Maria Teresa, Feijoo Gumersindo, Lema Juan M. (2006). Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64:408-414.

Fahy A, McGenity TJ, Timmis KN, Ball AS. (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol Ecol*;58:260–70.

Fang W, Zhang Y, Zheng X et al (2004) *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *J Invertebr Pathol* 85:18–24

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

Fenn, P., y Kirk T. K. (1981). Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporum*. *Arch. Microbiol.* 130:59-65.

Fennell D. I. (1973). Plectomycetes: Eurotiales. In *The fungi*, vol. IVA, pp. 45-68. Edited by C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York and London: Academic Press.

Fernandez, P., Grifoll M., Solanas A. M., Bayona J. M., y Albaige´s J. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26:817–829.

Fincham John R. S. (1989) Transformation in Fungi. *Microbiological Reviews* Vol. 53, No. 1 p. 148-170

Finzel, B. C., Poulos T. L., y Kraut J. (1984). Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 259:13027-13036.

Flotron V., J. Houessou, A. Bosio (2003). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using microwave-assisted solvent extraction: comparison with other extraction methods," *Journal of Chromatography A*, vol. 999, no. 1–2, pp. 175–184.

Fracchia, S., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J.A. (2000). Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant Soil* 223:175–184.

Freudenberg, K. (1968). In A. C. Neish and K. Freudenberg (ed.), *Constitution and biosynthesis of lignin*. Springer-Verlag, New York. The constitution and biosynthesis of lignin, p. 47-122

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev. Biochem.* 64:97–112.

Fromin, N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., Teyssier-Cuvelle S., Gillet F., Aragno M., y Rossi P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4:634–643.

Fungaro, M. H. P. ; Poli, R. C. ; Pizziranikleiner, A. A. ; Besin, E. ; Lejeune, B. ; Azevedo, J. L. (1997). Genetic and molecular analysis of *Aspergillus nidulans* transformants obtained by biolistic process. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 718-722.

Fukuzumi, T. (1987). In E. Odier (ed.), *Lignin enzymic and microbial degradation*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. Ligninolytic enzymes of *Pleurotus sajorcaju*, p. 137-142.

Gangavaram Lakshmi Prasanna, Mchunu Nokuthula, Ramakrishnan Priya, Singh Suren, Permaul Kungen. (2009) Improved electroporation-mediated non-integrative transformation of *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Microbiological Methods* 77:159-164.

Galliano, H., Gas G., y Boudet A. (1988). Biodegradation of *Hevea brasiliensis* lignocellulose by *Rigidoporus lignosus*: influence of culture conditions and involvement of oxidizing enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* 26:619-627.

García-Peña Inés, Ortiz Irmene, Hernández Sergio, Revah Sergio (2008) Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotti*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62:442-447.

Gardes M. y Bruns T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molec. Ecol.* 2:113-118.

Gaskell, G.J., Carter, D.A., Britton, W.J., Tovey, E.R. Benyod F.H. and Lowborg, U. (1997). Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi. *Electrophoresis.* 18:1567-1569.

Gawande, P.V.; Kamat, M.Y. (1999). Production of *Aspergillus niger* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *Journal Applied Microbiology.*, 87:511-519.

Gee, G. W., y Bauder J. W. (1986). Particle-size analysis. *Methods of soil analysis*. Part 1. Physical and mineralogical methods, p. 383–411. American Society of Agronomy, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis.

Giardina, P., Palmieri G., Fontanella B., Riviaccio V., y Sannia G. (2000). Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch. Biochem. Biophys.* 376:171–179.

Giardina, P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., y Sannia G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* 341:655–663.

Griffin, D.H. (1994) *Fungal Physiology*. Wiley-Liss, New York pp. 102–129.

Groot Marcel J. A., Bundock Paul, Hooykaas Paul J.J., y Beijersbergen Alice G.M. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* V16 pp839-842

Guerin T. F. (1998) The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 1, no. 1, pp. 63–67

Hammel, K. E. (1989). Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 11:776-777.

Hammel, K. E., Green B., y Gai W. Z. (1991). Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10605-10608.

Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen K.A. and Ryan Z.C. (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30:445–453.

Harvey, P. J., Candeias L. P., King P. J., Palmer J. M., y Wever R. (1995). Lignin peroxidase catalysis: reaction with veratryl alcohol and a polymeric dye, *Poly R. Biochem. Soc. Trans.* 23:340S.

Herzog R. W., Daniell H., Singh N. K., Lemke P.A. (1996) A comparative study on the transformation of *Aspergillus nidulans* by a microporjectile bombardment of conidia and a more conventional procedures using protoplasts treated with polyethylenglycol. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:333-337.

Hiei, Y., Ohta, S., Jomari, T., y Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.

Houbraken Jos., Samson Robert A., Frisvad Jens C. *Byssoschlamys*: significance of heat resistance and micotoxin production.

Hong-Gyu Song (1999) Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 669-672.

Houbraken Jos., Varga János, Rico-Munoz Emilia, Johnson Shawn, Samson Robert A. Sexual Reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssoschlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotti*). 2008. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, No.5 p 1613-1619.

Hooykaas, P.J.J. and Beijersbergen, A.G.M. (1994). The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* 32:157-179.

Glenn JK, Gold MH (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 242:329-341

Godfrey, B. J., Mayfield M. B., Brown J. A., y Gold M. H. (1990). Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 93:119-124.

Gold, M. H., Cheng T. M., y Alic M. (1983). Formation, fusion and regeneration of protoplasts from wild type and auxotrophic mutant strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 260-263

Gold, M. H., Brown J. A., Godfrey B. J., Mayfield M. B., Wariishi H., y Valli K. (1991). Structure and regulation of a manganese peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symp. Ser.* 460:188-199.

Gold Michael H and Frederic H. Perie. (1991) Manganese Regulation of Manganese Peroxidase Expression and Lignin Degradation by the White Rot Fungus *Dichomitus squalens* *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2240-2245

Gold, M. H., Glenn J. K., y Alic M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol.* 161:74-78.

Gold, M. H., Wariishi H., y Valli K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symp. Ser.* 389:127-140.

Gómez-Toribio V, Martínez AT, Martínez MJ (2001) Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 268:4787-4793

Gotoh O., Omura T, Ishimura Y, FujiiKuriyama Y. (1993) Evolution and differentiation of P450 genes. In *CytochromeP450 Second Edition* Edited by: Tokyo: Kodansha. 255-272.

Gouka Robin J., Peter J. Punt, y Cees A. M. J. J. Van den Hondel. (1997) Glucoamylase Gene Fusions Alleviate Limitations for Protein Production in *Aspergillus awamori* at the Transcriptional and (Post)Translational Levels *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 488-497

Guido Capotorti, Digiainvincenzo Paolo, Cesti Pietro, Bernardi Antonella & Guglielmetti Gianfranco. (2004) Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil *Biodegradation* 15: 79–85.

Hammel, K. E., y Moen M. A. (1991). Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 13:15-18.

Haritash A.K., Kaushik C.P., Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *J. Hazard. Mater.* (2009) doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137.

Haritash A.K., Kaushik C.P., Seasonal and spatial occurrence and distribution of respirable particulate bound atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Hisar city and their potential health-risks, *Asian J. Water Environ. Pollut.*, in press.

Harmsen, M. C., Schuren F. H. J., Moukha S. M., Van Zuilen C. M., Punt P. J., y Wessels J. G. H. (1992). Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporum* and *Agaricus bisporus*. *Curr. Genet.* 22:447-454.

Harshavardhan Doddapaneni, Ranajit Chakraborty y Jagjit S Yadav. (2005) Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : Evidence for gene duplications and extensive gene clustering *BMC Genomics*, 6:92

Harwood CS, Parales RE. (1996) The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol*; 50:553–90.

Hata, Y., Tsuchiya, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., y Hara, S., (1992) Nucleotide sequence and expression of the glucoamylase-encoding gene (*glaA*) from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 108, 145-150

Hatamoto, O., Watarai, T., Kikuchi, M., Mizusawa, K., y Sekine, H., (1996) Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 175, 215-221.

Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U (1997) Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:261–266

Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U (1998a) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol Lett* 165:43–50

Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U (1998b) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol* 64:2788–2793

Henrissat, B., Saloheimo M., Lavaitte S., y Knowles J. K. C. (1990). Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 8:251-257.

Hiroki Ishida, Yoji Hata, Akitsugu Kawato y Yasuhisa Abe. (2006) Improvement of the *glaB* promoter Expressed in Solid-State Fermentation (SSF) of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (5), 1181-1187.

Hisada, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., y Akita, O., (2005) Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 562-568.

Holzbaur, E. L. F., y Tien M. (1988). Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55:626-633.

Hong-Gyu Song (1999) Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 669-672.

Houbraken Jos, Varga Janos, Rico-Munoz Emilia, Johnson Shawn, y Samson Robert A. Sexual Reproduction as the Cause of Heat Resistance in the Food Spoilage Fungus *Byssoschlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*)

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1983) Benzo[a]pyrene, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, vol. 32, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, pp. 211–224.

Imagawa, M., Chiu R., y Karin M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. Cell 51:251-260.

Ileri V. Robles-González, Fava, Fabio y Héctor M Poggi-Varald. (2008) Review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and Sediments *Microbial Cell Factories* 7:5

Irie, T., Honda Y., Watanabe H. H. T., y Kuwahara M. (2000). Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. J. Wood Sci. 46:230–233.

Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., y Kumashiro T, (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat. Biotechnol. 14:745-750.

Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., y Kashiwagi, Y., (2004). Isolation of a novel promoter for efficient protein production in *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 1849-1857

Ishida, H., Matsumara, K., Hata, Y., Kawato, A., Suginami, K., Abe, Y., Imayasu, S., y Ichishima, E., (2001). Establishment of a hyper-protein production system in submerged *Aspergillus oryzae* cultura under tyrosinase encoding gene (melO) promoter control. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 131-137

Janse, B., Gaskell J., Akhtar M., y Cullen D. (1998). Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. Appl. Environ. Microbiol. 64:3536–3538.

Jeong-Dong Kim and Choul-Gyun Lee. (2007). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by bacterium-fungus co-cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering 12:410-416.

Jiang Q, Ying SH, Feng MG (2007) Enhanced frequency of *Beauveria bassiana* blastospore transformation by restriction enzyme-mediated integration and electroporation. J Microbiol Methods 69:512–517

Jin Kai, Zhang Yongjun, Luo Zhibing, Xiao Yuehua, Fan Yanhua, Wu Di, Pei Yan. (2008) An improved method for *Beauveria bassiana* transformation using phosphinothricin acetyltransferase and green fluorescent protein fusion gene as a selectable and visible marker. Biotechnol Lett. 30:1379-1383

Jiménez-Barbero J., Bernabé M., Leal J. A., Prieto A. y Gómez-Miranda B. (1993). Chemical structure and conformational features of cell-wall polysaccharides isolated from *Aphanoascus mephitalus* and related species. Carbohydr Res 250, 289-299.

Jimenez JI, Minambres B, Garcia JL, Diaz E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol;4:824–41.

Johnson, T. M., y Li J. K.-K. (1991). Heterologous expression and characterization of an active lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus. Arch. Biochem. Biophys. 291:371-378.

- Jocelyn Paré J. R., Jacqueline M., Belanger R., Lesnik Barry, Turpin Rodney and Singhvi Raj. (2001) Final evaluation of US EPA method 3546: Microwave extraction, a microwave-assisted process (MAP™) Method for the extraction of contaminants under closed-vessel conditions. *Soil and Sediment Contamination* 10(4):375-386.
- Kamitsuji, H., Honda Y., Watanabe T., y Kuwahara M. (2005). Mn²⁺ is dispensable for the production of active MnP2 by *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327:871–876.
- Kamitsuji, H., Watanabe T., Honda Y., y Kuwahara M. (2005). Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. *Biochem. J.* 386:387–393.
- Kapich AN, Steffen KT, Hofrichter M, Hatakka A (2005) Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochem Biophys Res Comm* 330:371–377.
- Kaplan, C. W., y Kitts C. L.. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1777–1786.
- Kapoor M. (1995). Gene Transfer by Electroporation of Filamentous Fungi. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 279-289.
- Kasuga, T., Woods C., Woodward S. and Mitchelson K. (1993) Heterobasidion annosum 5.8s ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: rapid identification of European interterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism. *Curr. Genet.* 24:433-436.
- Kaushik C.P., Haritash A.K., (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health, *Our Earth* 3 (3) 1–7.
- Kerem, Z., y Hadar Y. (1995). Effect of manganese on preferential lignin degradation by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3057–3062.
- Kersten, P., y Cullen D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 44:77–87.
- Keyser, P., Kirk T. K., y Zeikus J. G. (1978). Ligninolyticenzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J.Bacteriol.* 135:790-797.
- Khindaria, A., Nie G., y Aust S. D. (1997). Detection and characterization of the lignin peroxidase compound II-veratryl alcohol cation radical complex. *Biochemistry* 36:14181–14185.
- Kim, H.-Y., Leem, Y.-E., Choi, H.-T. & Song, H.-G. (1995) Decolorization of dyes by white rot fungi. *Korean Journal of Mycology* 23, 298-304.
- Kimura, Y., Asada Y., y Kuwahara M. (1990). Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:436 442.
- Kirk, T. K., y Farrell R. L. (1987). Enzymatic "combustion":the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
- Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K., y Tsukagoshi, N., (1998).Utilization of the TEF-alpha gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, pgaA and pgaB, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 85-92
- Kitamoto, N., Yoshino, S., Ito, M., Kimura, T., Ohmiya, K., y Tsukagoshi, N., (1998b).Repression of the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in *Aspergillus oryzae* by introduction of multiple copies of the xynF1 promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 558-563

Kluczek-Turpeinen B, Tuomela M, Hatakka A, Hofrichter M. (2003). Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Appl Environ Microbiol* 61:374-379.

Korda A, Santas P, Tenente A, Santas R: (1997) Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl Microbiol Biotech*, 48(6):677-686.

Koukaki M, Giannoutsou E, Karagouni A et al (2003) A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J Microbiol Methods* 55:687-695.

Kuwahara, M., y Asada Y. (1987). Production of ligninases, peroxidases and alcohol oxidase by *Phanerochaete chrysosporium* and its mutant, In E. Odier (ed.), Lignin enzymatic and microbial degradation. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. p. 171-176.

Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in *procaryotes*, *eucaryotes*, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47:1-45.

Lackner, R., Srebotnik E., y Messner K. (1991). Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:1092-1098.

Lambert, M., Kremer, S., Sterner, O. & Anke, H. (1994) Metabolism of pyrene by the Basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated processors in strain JK 375. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3597-3601.

Lange, B., Kremer, S., Sterner, O. & Anke, H. (1994) Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: Identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK364. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3602-3607.

Larena, Y., Salazar, O., González, V., Julián, M.C. y Rubio, V. (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycete. *Journal of Biotechnology* 75:187-194.

Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CC. (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* — masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol*;16:282-90.

Lau E. V., Gan S., Ng H. K. (2010) Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *International Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 2010. 1-9

Launen L., Pinto L., Wiebe C., Kiehlmann E., Moore M. (1995) The oxidation of pyrene and benzo(a)pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Canadian Journal Microbiology*. 41:477-488.

Leal J. A., Gómez-Miranda B., Prieto A., Donenech J., Ahrazem O. y Bernabé M. (1997). Possible chemotypes from cell wall polysaccharides as an aid in the systematics of the genus *Penicillium* and its teleomorphs states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Mycol Res* 101, 1259-1264.

Leigh MB, Prouzová P, Macková M, Macek T, Nagle DP, Fletcher JS. (2006) Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Appl Environ Microbiol* 72:2331-42. USEPA (United States Environmental Protection Agency) Priority pollutant list. Fed. L Reg. 40, Part 423, Appendix A. 1996.

Leisola, M. S. A., Kozulic B., Meussdoerffer F., y Fiechter A. (1987). Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 262:419-424.

Leisola, M. S. A., Thanei-Wyss U., y Fiechter A. (1985). Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol. 3:97-107.

Letellier M., Budzinski H., Garrigues P., Wise S. (1996/1197) Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in open cell from reference materials (sediment, soil, air particulates). Spectroscopy 13. 71-80.

Letellier M., Budzinski H., Bellocq J., Connan J. (1999) Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. Organ Geochemistry 30 1353-1365.

Letellier M., Budzinski H., Charrier L., Capes S., Dorthe A. M. (1999) Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. Fresenius J Anal Chem. 364:228-237.

Lestan, D. & Lamar, R.T. (1996) Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology 62, 2045±2052.

Linder M, Szilvay G, Nakari-Setälä T, Penttilä M (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microb Rev 29:877–896

Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. Annu. Rev.Biochem. 55:1151-1191.

Lin, Y.-S., y Green M. R. (1988). Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both Ela- and cyclic AMP-inducible promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3396-3400.

Lopez-Avila Vlorica, Youn Richard, Beckert Werner F. (1994). Microwave-Assisted Extraction of Organic Compounds from Standard Reference Soils and Sediments. Analytical Chemistry. 66:1097-1105.

Loser C., Ulbricht H., Seidel H. (2004) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in waste wood, Compost Sci. Util. 12:335–341.

Luangsa-ard Janet Jennifer, Manoch Leka, Hywel-Jones Nigel, Artjariyasripon Suparp, Samson Robert A. (2004) Thermotolerant and Thermoresistant *Paecilomyces* and its Teleomorphic States Isolated from Thai Forest and Mountain Soils Kasetart J. (Nat. Sci.) 37: 94-101.

Maarten D. Sollewijn Gelpke, Mayfield-Gambill Mary, Geoffrey P. Cereghino Lin, et al. (1999). Homologous Expression of Recombinant Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 65(4):1670-1674.

MacDonald, M. J., Paterson A., y Broda P. (1984). Possible relationship between cyclic AMP and idiophasic metabolism in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 160:470-472.

MacDonald, M. J., Ambler R., y Broda P. (1985). Regulation of intracellular cyclic AMP levels in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* during the onset of idiophasic metabolism. Arch. Microbiol. 142:152-156.

MacGillivray, A.R. y Shiaris, M.P. (1994). Microbial ecology of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), Degradation in coastal sediments. In: Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. Chaudhry G. R. (ed.). Dioscorides Press. Porthand, OR. pp. 125-139.

McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandez C, et al. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. Proc Natl Acad Sci USA;103:15582–7.

- Macnaughton, S. J., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G. A., Chang Y. J., y White D. C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3566–3574.
- Mandal Vivekananda, Mohan Yogesh, Hemalatha S. (2007). Microwave Assisted Extraction –An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*. Vol 1, 7-18
- Mandels M, Sternberg D: (1976) Recent advances in cellulase technology. *Ferment. Technol.*;54:267-286.
- Martens R & Zdražil F (1998) Screening of white rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia Microbiol.* 43:97–103.
- Martínez, A. T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme*
- Martinez A.T., (2002) *Enzyme Microb. Technol.* 30 425.
- Marquez, L., Wariishi H., Dunford H. B., y Gold M. H. (1988). Spectroscopic and kinetic properties of the oxidized intermediates of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 263:10549-10552.
- Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas F. J., Guille´n F., y Martínez A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237:424–432.
- Martínková Ludmila , Bronislava Uhnáková, Miroslav Pátek, Jan Nešvera, Vladimír Křen. (2009) Biodegradation potential of the *genus Rhodococcus* *Environment International* 35 162–177
- Matityahu Avi, Hadar Yitzhak, Dosoretz Carlos G., y Belinky Paula A. (2008) *Phanerochaete chrysosporium*_ *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5359–5365
- Matityahu Avi, Hadar Yitzhak, Dosoretz Carlos G., and Paula A. Belinky. (2008) Gene Silencing by RNA Interference in the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5359–5365
- Mayfield, M. B., Kishi K., Alic M., y Gold M. H. (1994). Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4303–4309.
- Mehdi Dashtban, Heidi Schraft, Wensheng Qin. (2009) Review Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives *International Journal of Biological Sciences*; 5(6):578-595
- Meyer V, Wedde M, Stahl U (2002) Transcriptional regulation of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol Genet Genomics* 266:747–757
- Meyer Vera, Mueller Dirk, Strowig Till, Stahl Ulf. (2003) Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet* 43:371-377.
- Microb. Technol* 30:425–444.
- Minetoki, T., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., y Tamura, G., (1995) Nucleotide sequence and expression of α -glucosidase-encoding gene (*agdA*) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1516-1521
- Minz Anna y Sharon Amir. (2010) Electroporation and Agrobacterium-mediated spore transformation. *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi, Methods in Molecular Biology*, vol. 638, pp: 21-32
- Mohan VS, Shailaja S, Krishna MR, Reddy KB, Sarma PN: (2006) Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. *Process Biochem*, 41(3):644-652.

- Moore Margo M. Genetic engineering of fungal cells. Genetic. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Biotechnology Vol 3:
- Moreira PR, Duez C, Dehareng D, Antunes A, Almeida-Vala E, Frère JM, Malcata FX, Duarte JC (2005) Molecular characterization of a versatile peroxidase from a Bjerkandera strain. J Biotechnol 118:339–352
- Muheim, A., Waldner R., Leisola M. S. A., y Fiechter A. (1990). An extracellular aryl alcohol oxidase from the white rot fungus Bjerkandera adusta. Enzyme Microb. Technol. 12:204-209.
- Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, T. A., y Martínez, J. M. (1997), *Curr. Microbiol.* 34, 1–5.
- Muñoz G, Nakari-Setälä T, Agosin E, Penttilä M (1997) Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 32:225–230.
- Murray Fiona, Llewellyn Danny, MacFadden Helen, Last David, Dennis Elizabeth S., y Peacock W. James. (1999). Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Molecular Breeding* 5: 219-232.
- Muyzer, G., De Waal E. D., y Uitterlinden A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.
- Naranjo Leopoldo, Urbina Hector, Angela de sisto, y Vladimir Leon (2007) Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil Biocatalysis and Biotransformation. 25: 341-349.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW Gene Silencing by RNA Interference in the White Rot Fungus
- Niku-Paavola, M. L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundell T., y Hatakka A. (1990). The effect of culture conditions on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *J. Biotechnol.* 13:211-221.
- Nogales, B., Moore E. R. B., Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R., y Timmis K. N. (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1874–1884.
- Novotný C., Erbanová P., Sašek V., Kubatova A., Cajthaml T., Lang E., Krahl J., Zadrazil F. (1999) Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 10:159–168.
- Nyysönen, E., y Keränen S. (1995). Multiple roles of the cellulase CBHII in enhancing production of fusion antibodies by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 28:71–79.
- Nyysönen, E., Penttilä M., Harkki A., Saloheimo A., Knowles J. K. C., y Keränen S. (1993). Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 11:591–595.
- Orth, A. B., Denny M., y Tien M. (1991). Overproduction of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2591-2596.
- Orth AB, Tien M: (1995) Biotechnology of lignin degradation. In *The Mycota II Genetics and Biotechnology* Edited by: Kuck. Berlin: Springer-Verlag :287-302.

Ozeki, K., Kanda, A., Hamachi, M., y Nunokawa, Y., (1996) Construction of a promoter probe vector autonomously maintained in *Aspergillus* and characterization of promoter regions derived from *A. niger* and *A. oryzae* genomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 383-389.

P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* (1996) 6:1-42.

Palma, C., Martínez A. T., Lema J. M., y Martínez M. J. (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 77:235–245.

Patnaik P. (1999). *A Comprehensive Guide to the Properties of Hazardous Chemical Substances*, 2nd ed., John Wiley & Sons Publishers.

Paszczyn'ski, A., Huynh V.-B., y Crawford R. L. (1986). Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the whiterotfungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 244:750-765.

Paszczynski A, Pasti MB, Goszczynski S, Crawford RL, Crawford DL (1992) Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl Environ Microbiol* 58:3598–3604

Pease, E. A., Andrawis A., y Tien M. (1989). Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: primary structure deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 264:13531-13535.

Pease, E. A., Aust S. D., y Tien M. (1991). Heterologous expression of active manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using the baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:897-903.

Pease, E. A., y Tien M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174:3532-3540.

Pena T., Pensado L., Casais C., Mejuto C., Phan-Tan-Luu R., Cela R. (2006) Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from finish samples. *Journal of Chromatography A*, 163-169

Perie Frederic H. y Michael H. Gold (1991) Manganese Regulation of Manganese Peroxidase Expression and Lignin Degradation by the White Rot Fungus *Dichomitus squalens* **Applied and Environmental Microbiology.*, p. 2240-2245

Pfeifer TA, Khachatourians GG (1992) *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:376–381

Pinelli D, Fava F, Nocentini M, Pasquali G: (1997) Bioremediation of apolycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by using different aerobic batch bioreactor system. *J Soil Contam*:243-256.

Piñeiro-Iglesias M., López-Mahía P., Vázquez-Blanco E., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D., Fernández-Fernández E. (2000) Microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from atmospheric particulate samples. *Fresenius J Anal Chem* 367:29-34

Pitt, J. I., Samson R. A., y Frisvad J. C. (2000). List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*, p. 9–49.

Pitt John I., Hocking Ailsa D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*. Third ed. Springer pp.184-186.

- Platt MW, Hadar Y, Chet I (1985) The decolorization of the polymeric dye poly-blue (polyvinylaminesulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 21:394–396
- Pointing, S.B. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biot.* 57:20–33.
- Potin, O., Rafin, C. and Veignie, E. (2004) Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54:45–52.
- Prenafeta-Boldu Francesc X., Summerbell Richard y Sybren de Hoog G. (2006) Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. *FEMS Microbiol Rev* 30:109-130.
- Pribnow, D., Mayfield M. B., Nipper V. J., Brown J. A., y Gold M. H. (1989). Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 264: 5036-5040.
- Prieto A., Leal J. A., Poveda A., Jiménez-Barbero J., Gómez-Miranda B., Domenech J., Ahrazem O. y Bernabé M. (1997). Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. *Carbohydr Res* 304, 281-291.
- Punt, P. J., Dingemans M. A., Jacobs-MeQsing B. J. M., Pouwels P. H., y Van den Hondel C. A. M. J. J. (1988). Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69:49-57.
- Punt P.J. y van den Hondel C.A.M.J.J. (1993) Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance marker. *Methods Enzymol.* 216:447-457.
- Raeder, U. y Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.
- Ravelet C, Krivobok S, Sage L, Steiman R (2000) Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40: 557–563
- Reddy, C. A., y D'Souza T. M. (1994). Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:137–152.
- Regalado V, Rodriguez A, Perestelo F, Carnicero A, De La Fuente G, Falcon MA. (1997) Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl Environ Microbiol* 63:3716-3718.
- Renganathan, V., Miki K., y Gold M. H. (1985). Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H₂O₂-requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 241:304-314.
- Renganathan, V., y Gold M. H. (1986). Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25:1626-1631.
- Richey M.G., Marek E.T., Schardl C. L. y Smith D.A. (1989) Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. *Phytopathology* 79:844-847.
- Ringelberg, D. B., Talley J. W., Perkins E. J., Tucker S. G., Luthy R. G., Bouwer E. J., y Fredrickson H. L.. (2001). Succession of phenotypic, genotypic, and metabolic community characteristics during in vitro bioslurry treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1542–1550.
- Ritch, T. G., Jr., Nipper V. J., Akileswaran L., Smith A. J., Pribnow D. G., y Gold M. H. (1991). Lignin peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* is synthesized as a preproenzyme. *Gene* 107:119-126.

Ritch, T. G., Jr., y Gold M. H. (1992). Characterization of a highly expressed lignin peroxidase-encoding gene from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 118:73-80.

Ritch, T. G., Jr., y Gold M. H.. Unpublished results.

Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Volke-Haller, V., Fernandez- Linares, L. and Rodriguez-Vazquez, R. (2002) Microbial populations in soil profiles affected by oil hydrocarbons at Tabasco state, Mexico. *Agrociencia* 36:149–160.

Robin J. Gouka, Peter J. Punt, Y Cees A. M. J. J. Van Den Hondel. (1997) Glucoamylase Gene Fusions Alleviate Limitations for Protein Production in *Aspergillus awamori* at the Transcriptional and (Post)Translational Levels * *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 488–497

Robinson M, Sharon A (1999) Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia. *Curr Genet* 36:98–104

Robles-González Ileri V, Fabio Fava y Héctor M Poggi-Varaldo. (2008) A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments *Microbial Cell Factories*, 7:5

Rodríguez-Vazquez, R., Cruz-Cordova, T., Fernandez-Sanchez, J.M., Roldan-Carrillo, T., Mendoza-Cantu, A., Saucedo-Castañeda, G., Tomasini-Campocoso, A. (1999) Use of bagasse pith as solid substrate for *P. chrysosporium* growth. *Folia Microbiol.* 44 (2):213–218.

Royer J.C., Moyer D.L., Reiwitch S.G., Madden M.S., Bech Jensen E., Brown S.H. y col., (1995). *Fusarium graminearum* A3/5 as a novel host for heterologous protein production. *Bio/Technology* 13:1479-1483.

Ruiz-Díez B. (2002) A review. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 92:189-195.

Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M. J., y Martinez A. T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* 29:116–122.

Ruiz-Dueñas, F. J., Guillen F., Camarero S., Perez-Boada M., M. J. Martinez, y Martinez A. T. (1999). Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4458–4463.

Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., De Clercq D., Coosemans J., Insam H., Swings J., (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes, *Ann. Microbiol.* 53:349–410.

Sabaté, J., Viñas M., y Solanas A. M. (2004). Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54:19–25.

Sabaté, J., Viñas M., y Solanas A. M. Bioavailability assessment and environmental fate of PAHs in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere*, in press.

Saim N., J. R. Dean, M. P. Abdullah, and Z. Zakaria (1997). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction," *Journal of Chromatography A*, vol. 791, no. 1–2, pp. 361–366.

Saloheimo, M., Barajas V., Niku-Paavola M.-L., y Knowles J. K. C. (1989). A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white-rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*. *Gene* 85:343-351.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sami Aifa Mohamed, Sayadi Sami y Gargouri Ali (1999) Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Aspergillus niger* Biotechnology Letters, 21:849-853.

Sampedro I., D'Annibale A., Ocampo J.A., Statzi S.R., García-Romera I. (2005) Bioconversión of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. Chemosphere 60:1393-1400.

Samson R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud Mycol* 6, 1-119.

Samson R.A., Houbraken J., Varga J., Frisvad J.C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs *Persoonia* 22: 14-27.

Samson R. A. y Pitt J. I. (ed.), Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press, Inc., New York, NY.

Sanchez C: (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv*;27:185-194.

Sánchez O, Aguirre J (1996) Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newsl* 43:48-51

Saparrat MCN, Margarita AM, Tournier HA, Cabello MN, Arambarri AM. (2000). Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Rev Iberoam Micol* 17:64-68.

Šašek Šašek, V. (2003). Why mycoremediations have not yet come into practice, p. 247-266. In V. Šašek, Glaser J. A., y Baveye P. (ed.), The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solution. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

Sasek V., Bhatt M., Cajthaml T., Malachova K., Lednicka D. (2003) Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44:336-342.

Saraswathy A., Hallberg R., (2005) Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene, *Microbiol. Res.* 160:375-383.

Sarikaya, A., y Ladisch M. R. (1997). Mechanism and potential applications of bio-ligninolytic systems in a CELSS. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62:131-149.

Schoemaker, H. E. (1990). On the chemistry of lignin biodegradation. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Neth.* 109:255-272.

Semarjit Shary, Kapich Alexander N., Panisko Ellen A., Magnuson Jon K., Daniel Cullen, and Hammel Kenneth E. (2008) Differential Expression in *Phanerochaete chrysosporium* of Membrane-Associated Proteins Relevant to Lignin Degradation. *Applied and Environmental Microbiology* p. 7252-7257

Serrano Silva Isis, da Costa do Santos Eder, Ragagnin de Menezes Cristiano, Fonseca de Faria Andreia, Franciscon Elisangela, Grossman Matthew, Regina Durrant Lucia. (2009) Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology* 100: 4669-4675.

Shary Semarjit, Alexander N. Kapich, Ellen A. Panisko, Jon K. Magnuson, Daniel Cullen, y Kenneth E. Hammel. (2008) Differential Expression in *Phanerochaete chrysosporium* of Membrane-Associated Proteins Relevant to Lignin Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7252-7257

Sheng, D., y Gold M. H. (1998). Irreversible oxidation of ferricytochrome c by lignin peroxidase. *Biochemistry* 37:2029–2036.

Siciliano, S. D., Germida J. J., Banks K., y Greer C. W. (2003). Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 483–489.

Silva Chitarra Gilma. (2003) Germination inhibitors of fungal spores: identification and mode of action. PhD thesis. Wageningen University, The Netherlands.

Singh P, Thakur IS. (2006). Colour removal of anaerobically treated pulp and paper mill effluent by microorganisms in two steps bioreactor. *Bioresour Technol* 97:218-223.

Singh H. (2006) *Mycoremediation, Fungal Bioremediation*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ,.

Smith K. E. C., G. L. Northcott, and K. C. Jones (2006). Influence of the extraction methodology on the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pasture vegetation. *Journal of Chromatography A*, vol. 1116, no. 1–2, pp. 20–30.

Sollewijn Gelpke, M. D., Lee J., y Gold M. H. (2002). Lignin peroxidase oxidation of veratryl alcohol: effects of the mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L. *Biochemistry* 41:3498–3506.

Spadaro JT, Gold MH, Reganathan V (1992) Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58:2397–2401

Stajic Mirjana, Persky Limor, Cohen Emanuel, Hadar Yitzhak, Brceski Ilija, Wasser Solomon P., y Eviatar Nevo. (2004) Screening of Laccase, Manganese Peroxidase, and Versatile Peroxidase Activities of the Genus *Pleurotus* in Media With Some Raw Plant Materials as Carbon Sources *Applied Biochemistry and Biotechnology* pg 155-164. Vol. 117,

Sugano Y., Matsushima Y., Shoda M. (2006) BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* *Appl Microbiol Biotechnol* 73:862–871

Suzuki S. (1994). *Talaromyces spectabilis*, a new species of food-borne ascomycetes. *Mycotaxon* 50:81–88.

Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G., y Hara, S., (1991). Identification of the promoter region of the Taka-amylase A gene required for starch induction. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1939-1941

Tanaka H, Itakura S, Enoki A: (1999) Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung*; 53:21–28.

Taylor, J. W., Pitt J. I. y Hocking A. D. (1990). Ribosomal DNA restriction studies of *Talaromyces* species with *Paecilomyces* and *Penicillium* anamorphs. In *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, pp. 357-370. Edited by R. A. Samson and J. I. Pitt. New York: Plenum.

Tien M, Kirk TK (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2280–2284

Tien, M., y Myer S. B. (1990). Selection and characterization of mutants of *Phanerochaete chrysosporium* exhibiting ligninolytic activity under nutrient-rich conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2540-2544.

- Tien, M., y Tu C.-P. D. (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature (London)* 326:520-523. (Corrigendum, 328:742.)
- Tonon, F., Prior de Castro C., y Odier E. (1990). Nitrogen and carbon regulation of lignin peroxidase and enzymes of nitrogen metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Exp.Mycol.* 14:243-254.
- Torsvik, V., Ovreas L., y Thingstad T. F. (2002). *Prokaryotic* diversity magnitude dynamics, and controlling factors. *Science* 296:1064–1066.
- Tsukihara Takahisa, Yoichi Honda, Ryota Sakai, Takahito Watanabe, y Takashi Watanabe. (2008) Mechanism for Oxidation of High-Molecular-Weight Substrates by a Fungal Versatile Peroxidase, MnP2. *Applied and Environmental Microbiology*, , p. 2873–2881
- Tuor, U., Wariishi H., Schoemaker H. E., y Gold M. H. (1992). Oxidation of phenolic arylglycerol-3-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. *Biochemistry* 31:4986-4995.
- Udagawa S, Takada M. (1973). The rediscovery of *Aphanoascus cinnabarinus*. *J Japan Bot* 48:21–26.
- Udawa S., Suzuki S. (1994). *Talaromyces spectabilis*, a new species of food-borne ascomycetes. *Mycotaxon* 50: 88-91
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1987) Health and Environmental Effects Profile for Phenanthrene. Prepared by the Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, for the Office of Solid Waste and Emergency Response. ECAO-CIN-P226.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1993) Health Assessment Summary Tables. Annual FY-93. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response, Washington, DC.
- Van der Geize R., Dijkhuizen L. Harnessing (2004) The catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr Opin Microbiol*;7:255–61.
- Van den Hondel, C. A. M. J. J., Punt P. J., y Van Gorcom R. F. M. (1991). Heterologous gene expression in filamentous fungi, p. 396–428. *In* J. W. Bennet y L. L. Lasure (ed.), *More gene manipulations in fungi*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Van de Rhee M.D., Graca P.M.A., Huizing H.J., y Mooibroek H. (1996). Transformation of the cultivated mushroom *Agraricus bisporus* to hygromycin B resistance. *Mol. Gen. Genet.* 250:252-258.
- van Groenestijn J. W. and Liu J.X. (2002) Removal of alpha-pinene from gases using biofilters containing fungi. *Atmospheric Environment* 36:5501-5508
- Valli, K., Brock B. J., Joshi D., y Gold M. H. (1992). Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:221-228.
- Valli, K., y Gold M. H. (1991). Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 173:345-352.
- Valli, K., Wariishi H., y Gold M. H. (1992). Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174:2131-2137.

- Van Gorcom, R. F. M., Punt P. J., y Van den Hondel C. A. M. J. J. (1994). Heterologous gene expression in *Aspergillus*, p. 241–250. In K. A. Powell (ed.), *The genus Aspergillus*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P. and Cazier, F. (2004) Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environ. Pollut.* 129:1–4.
- Verdin A, Lounes-Hadj Sahraoui A & Durand R (2004) Degradation of benzo(a)pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int Biodeterior Biodegrad* 53:65–70.
- Verdoes, J. C., Punt P. J., y Van den Hondel C. A. M. J. J. (1995). Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by *filamentous fungi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:195–205.
- Vicente M. F., Basilio A., Cabello A. y Peláez F. (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect.* 9: 15-32.
- Vidali M: Bioremediation. (2001) An overview. *Pure Appl Chem*,73(7):1163-1172.
- Viñas Marc, Jordi Sabate, Maria José Espuny, y Anna Solanas M. (2005) Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7008–7018.
- Von Heone, G. (1985). Signal sequences: the limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184:99-105.
- Vyas, B.R.M., Bakowski, S., Sasek, V. & Marucha, M. (1994) Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 14, 65-70.
- Wang Cuiping, Sun Hongwen, Li Jieming, Li Yimeng, Zhang Qingmin. (2009) Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere* 77: 733-738.
- Wanrishi, H., Valli K., y Gold M. H. (1989). Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28:6017-6023.
- Ward E.R. y Barnes W.M. (1989). Transformation of *Aspergillus awamori* and *A. niger* by electroporation. *Experimental Mycology* 13:289-293.
- Ward, M., Wilson L. J., Kodama K. H., Rey M. W., y Berka R. M. (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio/Technology* 8:435–440.
- Ward, P. P., Piddington C. S., Cunningham G. A., Zhou X., Wyatt R. D., y Conneely O. M. (1995). A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/Technology* 13:498–503.
- Wariishi, H., Akileswaran L., y Gold M. H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27:5365-5370.
- Wariishi, H., y Gold M. H. (1990). Lignin peroxidase compound III: mechanism of formation and decomposition. *J. Biol.Chem.* 265:2070-2077.
- Wariishi, H., Valli K., y Gold M. H. (1991). In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:269-275.

- Wariishi, H., Valli K., y Gold M. H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267:23688-23695.
- Warlishi, H., Dunford H. B., MacDonald I. D., y Gold M. H. (1989). Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: transient-state kinetics and reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 264:3335-3340.
- Weaver James C. (1995). Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 1-26.
- Wessels JG (1997) Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol* 38:1-45.
- Wild S.R., Jones K.C., (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environ. Pollut.* 88 (1) 91-108.
- White T.J., Bruns T., Lee S. y Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Inns, M.A.; Gelfend, D.H.; Sninsky, J.J. and White T.J. (eds) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp:315-322.
- Winans, S.C. (1992). Two way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56:12-31.
- Wingender, E. (1988). Compilation of transcription regulating proteins. *Nucleic Acids Res.* 16:1879-1902.
- Withers HL. (1995). Direct Plasmid Transfer Between Bacterial Species and Electrocuring. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 47-54.
- Wösten H (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 55:625-646.
- Wrenn, B. A., y Venosa A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42:252-258.
- Yasushi Sugano, Yuko Matsushima & Makoto Shoda *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 73:862-871
- Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1470-1474
- Yergalem T. Meharena, Patricia Oertel, Bhaskar B., y Thomas L. Poulos. (2008) Engineering Ascorbate Peroxidase Activity into Cytochrome c Peroxidase, *Biochemistry*. September 30; 47(39): 10324-10332.
- Ying SH, Feng MG (2006) Novel blastospore-based transformation system for integration of phosphinothricin resistance and green fluorescence protein genes into *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:206- 210
- Youngs, H. L., Sollewijn Gelpke M. D., Sundaramoorthy D. Li, M., y Gold M. H. (2001). The role of Glu39 in MnII binding and oxidation by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 40: 2243-2250.
- Zhang, Y. Z., C. A. Reddy, and A. Rasooly. (1991) Un mapeo con la nucleasa S1 ha confirmado que la transcripción inicia rio abajo de estas secuencias (Zhang y col., 1991)... Cloning of several lignin peroxidase (LIP)-encoding genes: sequence analysis of the LIP6 gene from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 97:191-198

Zhang C, Hughes JB, Nishino SF, Spain JC (2000) Slurry-phase biological treatment of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene: role of bioaugmentation and effects of high dinitrotoluene concentrations. *Environ Sci Technol*, 34(13):2810-2816.

Zhang Zhanxia, Xiong Guohua, Lie Gongke, He Xiaoqing. (2000) Sample Pretreatment with Microwave-Assisted Techniques. *Analytical Sciences* 16:221-224.

Zorn, H., Langhoff S., Scheibner M., Nimtz M., y Berger R. G. (2003). A peroxidase from *Lepista irina* cleaves carotene to flavor compounds. *Biol. Chem.* 384:1049–1056.

Zucchi, M., Angiolini L., Borin S., Brusetti L., Dietrich N., Gigliotti C., Barbieri P., Sorlini C., y Daffonchio D.. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. *J. Appl. Microbiol.* 94:248–257.