



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**“Evaluación del crecimiento sobre dibutil
ftalato de cepas de hongos aislados del proceso de
reciclado de una industria productora de papel”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a
L.C.F. Miriam Ahuactzin Pérez

Comité Tutorial

Directora de Tesis
Dra. Carmen Sánchez Hernández

Tutores
Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana
Dr. Jorge Soriano Santos
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tlaxcala, Tlax.

Octubre, 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Miriam Ahuactzin Pérez** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "Evaluación del crecimiento sobre dibutil ftalato de cepas de hongos aislados del proceso de reciclado de una industria productora de papel".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 13 DE 2011


DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA


DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE


DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ


DR. JORGE SORIANO SANTOS


DR. SAÚL TLECUÍTL BERISTAIN


DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández en el laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

- Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el cual está registrado en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP).
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 230571 otorgada para la realización de este posgrado.
- A la Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández por sus enseñanzas, consejos, conocimientos y comprensión que compartió conmigo estos dos años. Mejor directora de tesis no pude haber elegido pues me ha ayudado a tener claras las metas que quiero cumplir en un futuro.
- Al Dr. Gerardo Díaz Godínez, por compartirme sus conocimientos en el área experimental y teórica que me ayudaron a concluir con esta tesis en tiempo y forma.
- A la Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana, por la buena disposición mostrada en todo momento y por las aportaciones realizadas a la tesis.
- Al Dr. Jorge Soriano Santos por las aportaciones realizadas a la tesis.
- Al Dr. Jorge Carrera, por aceptar ser parte del jurado evaluador de mi proyecto y por sus atinadas observaciones al mismo.

Dedicatoria

A mi hijo Carlos, pues desde que llegaste me has motivado a ser mejor persona tanto en el ámbito familiar como en el profesional para que te sientas orgulloso de tu mamá que tanto te ama. Eres un angelito que llegaste en el momento indicado para mí. Gracias por el apoyo tan importante que me has otorgado a tu corta edad. Te amo con todo mi corazón y mi ser.

A mi esposo Carlos, por el apoyo incondicional que siempre me has dado y por la comprensión para que pueda realizar las metas profesionales y personales que tenemos trazadas para esta familia. Te amo con todo mi corazón y mi ser.

A mis padres, Jaime Amador Ahuactzin Toledano y Miriam Pérez Montiel, que siempre me han enseñado que el camino del éxito es esforzarse por alcanzar lo que queremos. Les agradezco por enseñarme que no existen obstáculos ni barreras cuando se trata de obtener lo que deseamos. Les agradezco por todo el apoyo, que es infinito, para que pudiera concluir esta maestría y más. Por último, les agradezco por el amor incondicional que siempre me han demostrado. Los amo con todo mi corazón y mi ser.

Agradecimientos a título personal

- A DIOS, por todo y todo lo que ocurre en mi vida.
- A José Luis Torres García, Adriana Madrid Ramírez y Rodrigo Arciniega Matlalcuantzi porque solo ustedes saben cuánto influyeron para que pudiera acabar esta tesis. Los quiero, son unos amigos increíbles.
- A mi hermano, Iván Ahuactzin Pérez, por los consejos tan atinados que siempre me has dado.
- A mi cuñada, Adriana Vázquez Molina, por el apoyo que me brindaste durante estos dos años.
- A mi sobrino, Adrián Ahuactzin Vázquez, por ser el compañero incondicional de mi Carlitos.
- A mis tíos, Alberto y Geo por apoyarme incondicionalmente tanto el laboral como en lo personal. Gracias por todo el cariño que siempre me han demostrado y por creer en mí.
- A mis tíos, primos y abuelito por siempre creer en mí.

RESUMEN

El Dibutil ftalato (DBF) es un contaminante del medio ambiente y tóxico para el humano. En la actualidad existen escasos estudios sobre la degradación de este plastificante utilizando hongos y sobre la toxicidad de los productos obtenidos derivados del crecimiento de estos organismos. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue evaluar el crecimiento sobre DBF de *Neurospora sp*, *Hypocrea lixxi* y *Aspergillus niger* (cepas aisladas previamente del proceso de reciclado de una industria productora de papel) con el objeto de determinar si estas cepas utilizan este compuesto como fuente de carbono y energía así como la toxicidad de los productos generados después de la degradación de estos compuestos. Para realizar este propósito, se utilizaron tres medios de cultivo diferentes: 1) medio con 1000 mg/l de DBF, 2) medio con 500 mg/l de DBF y 3) medio sin adición de ftalato. En general, las tres cepas de hongos estudiadas fueron capaces de crecer en los dos medios de cultivo que contenían diferente concentración de DBF. Asimismo, se observó que la cepa de *Neurospora sp* presentó mayor velocidad radial (V_r) en el medio que contenía 1000 mg/l de DBF en comparación con las otras dos cepas. La cepa de *Aspergillus niger* produjo mayor biomasa en el medio de cultivo de 500 mg/l de DBF en comparación con las otras dos cepas. La cepa de *Hypocrea lixxi* mostró mayor velocidad de crecimiento específica (μ) en comparación con las otras dos cepas en el medio de 500 mg/l de DBF. Para las tres cepas de hongos, se observó que el pH de los medios de cultivo disminuyó conforme aumentaba el tiempo de incubación. Con respecto al ensayo de toxicidad, se determinó que para el DBF, la CI_{50} fue de 473 mg/l. Se observó desarrollo de colonias de *E. coli* desde el inicio de la fermentación. El número de colonias de la bacteria aumentaba a medida que transcurrían los días de incubación. En las tres cepas se observó un mayor número de colonias en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF. La zona joven (ZM) y la zona madura (ZM) en medio sólido de las tres cepas de hongos, mostraron mayor grosor de la pared y diámetro de la hifa en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF.

Asimismo, las tres cepas de hongos mostraron mayor grosor de la pared y diámetro de las hifas durante los 21 días de fermentación en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF. Estos resultados muestran que las cepas de hongos pueden utilizar el DBF como fuente de carbono y energía, que la pared celular de las hifas no es afectada por este compuesto y que los productos generados después de la degradación de este ftalato no son tóxicos. Esta es una forma de evaluar de manera indirecta la toxicidad de los productos de degradación de los ftalatos.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ftalatos.....	1
1.2. Dibutil ftalato (DBF).....	2
1.3. Concentración inhibitoria media de una sustancia tóxica (CI ₅₀).....	4
1.4. Estructura de las hifas en el desarrollo de los hongos	5
1.5. Ascomicetos.....	7
1.5.1. Morfología y estructura.....	8
1.5.2. Ciclo de vida y reproducción sexual y asexual.....	9
1.5.3. Sistema enzimático.....	11
1.6. Microorganismos de interés.....	12
1.6.1. <i>Neurospora</i> sp.....	12
1.6.2. <i>Hypocrea lixii</i>	12
1.6.3. <i>Aspergillus niger</i>	13
1.6.4. <i>Escherichia coli</i>	14
2. ANTECEDENTES.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos particulares.....	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1. Velocidad de crecimiento radial (V _r).....	21
6.2. Velocidad específica de crecimiento (μ).....	22
6.3. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias.....	22
6.4. Determinación de la CI ₅₀ de DBF.....	23
6.4.1. Preparación del inóculo para la determinación de la CI ₅₀ del plastificante	23

6.4.2. Medios de cultivo para la determinación de la CI ₅₀ de DBF.....	23
6.4.3. Determinación de la curva estándar de DBF y de la CI ₅₀	23
6.5. Determinación del grosor de la pared y diámetro de hifas de la ZJ y ZM de las cepas de de <i>Neurospora</i> sp, <i>Hypocrea lixii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	24
6.6. Determinación del grosor de la pared y diámetro de hifas del sobrenadante de la fermentación líquida de las cepas de de <i>Neurospora</i> sp, <i>Hypocrea lixii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	24
7. RESULTADOS.....	26
7.1. Evaluación de la velocidad de crecimiento radial de las tres cepas de hongos aisladas de la industria productora de papel	26
7.2. Evaluación de la velocidad específica de crecimiento y pH de la fermentación líquida de las tres cepas de hongos aisladas de la industria productora de papel	29
7.3. Realización de la curva estándar de DBF y determinación de la CI ₅₀	31
7.4. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida de <i>Neurospora</i> sp mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias en los tres medios de cultivo	37
7.5. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida de <i>Hypocrea lixii</i> mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias en los tres medios de cultivo	39
7.6. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida de <i>Aspergillus niger</i> mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias en los tres medios de cultivo	41
7.7. Determinación del grosor de la pared y diámetro de la hifa de la ZJ y ZM de las cepas de <i>Neurospora</i> sp, <i>Hypocrea lixii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	43
7.8. Determinación del grosor de la pared de la hifa del sobrenadante de la fermentación líquida de las cepas de <i>Neurospora</i> sp, <i>Hypocrea lixii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	50
7.9. Determinación del diámetro de la hifa del sobrenadante de la fermentación líquida de las cepas de <i>Neurospora</i> sp, <i>Hypocrea lixii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	53

8. DISCUSIÓN.....	56
9. CONCLUSIONES.....	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
11. REFERENCIAS.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. V_r (mm/h) de las tres cepas de hongos filamentosos.....	27
Tabla 2. Biomasa (mg/ml) obtenida al final del avance radial de las tres cepas de hongos filamentosos.....	28
Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) de las tres cepas de hongos filamentosos.....	30
Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (10^9)/ml obtenidas en agar R ₂ A conteniendo diferentes concentraciones de DBF.....	34
Tabla 5. Parámetros utilizados para obtener la CI_{50} de DBF	35
Tabla 6. Grosor de la pared (μm) de la ZJ de las tres cepas de hongos filamentosos.....	45
Tabla 7. Grosor de la pared (μm) de la ZM de las tres cepas de hongos filamentosos.....	46
Tabla 8. Diámetro de las hifas (μm) de la ZJ de las tres cepas de hongos filamentosos.....	48
Tabla 9. Diámetro de las hifas (μm) de la ZM de las tres cepas de hongos filamentosos.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Estructura química del DBF.....	2
Fig. 2. Ciclo de vida de los ascomicetos	11
Fig. 3. pH del sobrenadante de los cultivos durante el tiempo de fermentación líquida de <i>Neurospora</i> sp desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)	31
Fig. 4. pH del sobrenadante de los cultivos durante el tiempo de fermentación líquida de <i>Hypocrea lixii</i> desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)	32
Fig. 5. pH del sobrenadante de los cultivos durante el tiempo de fermentación líquida de <i>Aspergillus niger</i> desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)	33
Fig. 6. Porcentaje de mortalidad de colonias de <i>E. coli</i> obtenidos a diferentes concentraciones de DBF.....	36
Fig. 7. Número de colonias de <i>E. coli</i> obtenidas a lo largo de la fermentación líquida en el sobrenadante de los cultivos de <i>Neurospora</i> sp desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●).....	38
Fig. 8. Número de colonias de <i>E. coli</i> obtenidas a lo largo de la fermentación líquida en el sobrenadante de los cultivos de <i>Hypocrea lixii</i> desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●).....	40
Fig. 9. Número de colonias de <i>E. coli</i> obtenidas a lo largo de la fermentación líquida en el sobrenadante de los cultivos de <i>Aspergillus niger</i> desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●).....	42
Fig. 10. Grosor de la pared de la hifa de <i>Neurospora</i> sp de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●).....	50

Fig. 11. Grosor de la pared de la hifa de <i>Hypocrea lixii</i> de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato	51
(●).....	
Fig. 12. Grosor de la pared de la hifa de <i>Aspergillus niger</i> de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato	52
(●).....	
Fig. 13. Diámetro de la hifa de <i>Neurospora</i> sp de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato	53
(●).....	
Fig. 14. Diámetro de la hifa de <i>Hypocrea lixii</i> de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato	54
(●).....	
Fig. 15. Diámetro de la hifa de <i>Aspergillus niger</i> de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato	55
(●).....	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ftalatos

Los ftalatos son dialquil o arilalquil ésteres derivados del ácido ftálico (ácido 1-2 bencendicarboxílico). Poseen tres isómeros conformados por el *orto* o ácido ftálico (AF), *para* o ácido tereftálico (AT) y *meta* o ácido isoftálico (AI) (Liang y cols. 2008). Asimismo, son líquidos claros de aspecto aceitoso, poco solubles en agua y con una volatilidad baja. Presentan principalmente dos cadenas laterales alifáticas o lineales pero también pueden presentar grupos alifáticos ramificados, cicloalifáticos o aromáticos (ECPI 2001, Mendoza 2008).

Estos compuestos químicos proporcionan flexibilidad y manejabilidad tanto en la manufactura del proceso como al producto final. Se utilizan ampliamente como plastificantes en la producción de PVC. Además, se usan en la manufactura de plásticos, textiles, papel, repelente contra insectos, pesticidas, cosméticos, polivinil acetatos y poliuretanos. También se emplean para la elaboración de pinturas, lacas, adhesivos, lubricantes, fragancias, recubrimientos de piso, papel tapiz, alfombras, vestiduras de muebles, impermeabilizantes, mangueras, películas fotográficas, manteles, juguetes y cepillos dentales (Chang y cols. 2004, Kim y cols. 2002, Mendoza 2008, Bustamante y cols. 2001).

Los ftalatos, cuando se emplean como plastificantes, no se unen químicamente al polímero y pueden migrar eventualmente al ambiente (Liang y cols. 2008). Se ha estimado que la tasa promedio de consumo indirecto de estos compuestos por el humano es de 8 mg/persona/día. La producción de plastificantes en Estados Unidos de Norteamérica rebasa los 500 millones de kilogramos por año (Chang y cols. 2008; Kim y cols. 2002, Mendoza 2008, Bustamante y cols. 2001). Estos contaminantes se han detectado en aire, suelo, sedimentos y agua como resultado de la producción, uso y disposición de los plásticos (Liang y cols. 2008).

1.2. Dibutil ftalato (DBF)

El DBF es un líquido inodoro de color amarillo cuyo peso molecular es 278.34 gr/mol. Pertenece a la familia de los ésteres de ácido ftálico. Presenta baja solubilidad en agua pero alta en octanol. En consecuencia, este contaminante tiende a acumularse en suelo o sedimentos. El nivel de penetración depende de su solubilidad, de su coeficiente de partición y de su tasa de degradación por rutas químicas o biológicas (Xiaoran 2007) (Fig. 1).

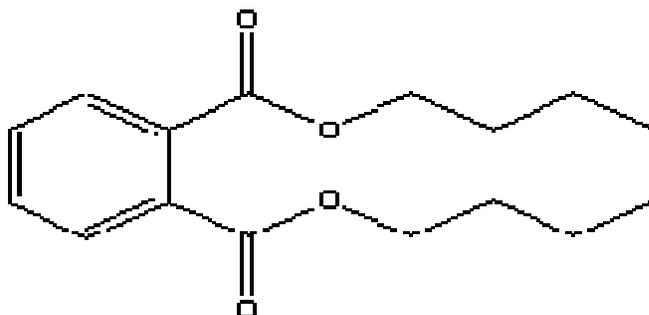


Fig 1. Estructura química del DBF

Seis ftalatos se han designado como contaminantes por la Environmental Protection Agency (EPA): dibutil ftalato (DBF), dimetil ftalato (DMF), dietil ftalato (DEF), butil bencil ftalato (BBzF), di-n- octil ftalato (DnOF) y dietilhexil ftalato (DEHF) (Furtmann 1994).

El DBF posee excesiva importancia por su producción y aplicación. Asimismo, se producen cerca de veintiséis mil toneladas al año desde hace más de 40 años en la Unión Europea (CERHR 2006). Se emplea principalmente en los productos de uso cotidiano y de cuidado personal como desodorantes, perfumes, lociones de afeitar, champús y geles (ECB 2003).

El DBF no forma enlaces covalentes con el plástico por lo tanto se libera al ambiente con el tiempo y el uso (Lee y cols.2007). Se ha reportado que las altas concentraciones del tóxico en el ambiente se encuentran mayoritariamente en las aguas residuales y superficiales cercanas a las zonas de producción y procesado (CERHR 2006).

Este plastificante se acumula en invertebrados, peces y plantas. La mayor fuente de exposición a ftalatos se da por ingesta de alimentos, probablemente por la alta migración de los ftalatos contenidos en los contenedores de plástico. Existen reportes de hepatotoxicidad, atrofia

testicular, teratogénesis y carcinogénesis relacionados con ftalatos (Huber y cols. 1996, Hashizume y cols. 2002).

Para reducir los efectos dañinos de DBF es necesario degradarlo y mineralizarlo. Numerosos estudios han demostrado que los plastificantes con cadenas cortas como el Dimetilftalato (DMF), Difenilftalato (DFF), Butilbencilftalato (BBF) y Dibutilftalato (DBF) pueden ser rápidamente degradados y mineralizados en comparación con los de cadenas largas como el Dietilhexilftalato (DEHF) y Dioctilftalato (DOF) que son menos susceptibles a la degradación (Wang y cols. 2000, Chang y cols. 2008). Esta diferencia de degradabilidad se debe al impedimento estérico que provocan las cadenas largas. Como consecuencia, esconden los centros de unión de las enzimas inhibiendo la hidrólisis del ftalato (Xia y cols. 2004).

Existen investigaciones acerca de la degradación de DBF de manera biológica (Hashizume y cols. 2002). Se ha observado la efectividad del sistema ligninocelulósico de los hongos de pudrición blanca para degradar el DBF a CO₂. Este tipo de hongos muestran capacidades oxidativas para degradar varios contaminantes como compuestos clorados y fenólicos. Debido a la poca especificidad de las enzimas les permite degradar mezclas complejas de estos contaminantes. Las enzimas presentes en este sistema extracelular (lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas) se relacionan con la biodegradación de plastificantes. Por lo tanto, los hongos poseen varios méritos en la biodegradación de compuestos tóxicos, por la habilidad de mineralización, oxidación de sustratos insolubles y secreción de enzimas extracelulares (Lee y cols. 2007).

En general, sin importar el medio en el que se encuentren, la biodegradación de ftalatos tiene características similares. Éstas se enlistan a continuación: 1) existe una disminución en la degradación conforme aumenta la cadena carbonada, 2) la degradación anaeróbica es generalmente más lenta que la aeróbica, 3) la degradación primaria del ftalato es de primer orden y 4) altas concentraciones del plastificante o de sus metabolitos inhiben su biodegradación (Liang y cols. 2008).

1.3 Concentración inhibitoria media de una sustancia tóxica (CI₅₀)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) ha sido el indicador más utilizado, en terapia antimicrobiana, durante décadas. Esta CMI se define como la concentración más baja de medicamento que previene el crecimiento visible de microorganismos luego de 24 horas de cultivo. La CMI se considera un parámetro fundamental, sin cuyo conocimiento no se tendría éxito en la terapia antibacteriana.

Sin embargo, este parámetro también se utiliza para medir el efecto de la concentración de desinfectantes (cloro), sustancias tóxicas o contaminantes en un microorganismo en específico. Por lo tanto, la CMI es la concentración más baja de la sustancia utilizada que mantiene o reduce la viabilidad del inoculo microbiano.

Asimismo, la concentración inhibitoria media (CI₅₀) es una medida de la efectividad de un compuesto para inhibir una función biológica o bioquímica. Este parámetro cuantitativo indica cuanto se necesita de algún medicamento en particular u otra sustancia (inhibidor) para inhibir un proceso biológico (o componente de un proceso como enzimas, células, receptores o microorganismos) en un 50%. Este concepto se utiliza comúnmente para medir la potencia antagonista de un medicamento. De acuerdo con la FDA (Food and Drug Administration), la CI₅₀ representa la concentración de la sustancia utilizada que es requerida para inhibir el 50% del crecimiento microbiano en experimento in vitro. Este parámetro es comparable con la DL₅₀. Sin embargo, ésta se utiliza para experimentos in vivo (Cheng y Prusoff 1973, Hoetelmans 2011).

Se ha reportado la CMI y CI₅₀ de DEF para *E. coli*, *Aspergillus niger* y *Staphylococcus aureus*. Esta CMI está definida como la concentración mínima de DEF a la cual el crecimiento microbiano de los tres microorganismos fue inhibido. La CI₅₀ la definieron como la concentración de DEF que inhibe el 50% de la tasa de crecimiento microbiano (Gogra y cols. 2010).

1.4. Estructura de las hifas en el desarrollo de los hongos

El aspecto básico, figura y estructura de un organismo (hongo, planta o animal) no se originan al mismo tiempo. El aspecto y la forma emergen como resultado de una serie de ajustes que ocurren durante el crecimiento. Cada uno de estos ajustes son usualmente irreversibles dentro de la secuencia morfogénica pero generalmente reversibles cuando ocurren alteraciones graves como trasplantes nucleares y celulares, regeneración después de un daño, etc. El proceso completo en el cual la organización final y patrones del organismo son establecidos se conoce como morfogénesis (Moore 1998).

El desarrollo de distintos patrones del micelio fúngico es una consecuencia directa de su crecimiento. En algunos casos, el desarrollo micelial de un inoculo no diferenciado a estructuras complejas con distintas zonas de diferenciación celular forman patrones como los anillos concéntricos cuando se encuentra en un medio sólido. En la naturaleza, el micelio fúngico se observa muy rara vez. Además, éste puede crecer como una enorme masa esparcida por debajo de la tierra y entre los organismos vivos que se encuentran cerca. La estructura micelial puede tomar distintas formas, incluyendo riziformos, micorrizas, esclerotia o una forma difusa parecida a la que se obtiene en un laboratorio. Esta forma difusa también llamada colonia se observa cuando el hongo crece sobre una superficie de agar. Esta colonia se acerca a una colección de organismos independientes los cuales forman una red de células tubulares que interactúan para formar la fase vegetativa del hongo. Esto permite las funciones de adquisición de nutrientes, crecimiento, dormancia y migración. Además, esta fase forma la estructura de soporte para el desarrollo del cuerpo fructífero (Moore 1998).

El micelio es responsable de desarrollar respuesta a factores ambientales usando un repertorio restringido de formas celulares (forma tubular). Por esta razón, los hongos se adaptan fácilmente al crecimiento en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, el micelio fúngico se considera ideal para el estudio experimental de los mecanismos de desarrollo. El micelio se desarrolla por el crecimiento de células individuales, las cuales por elongación, ramificación y fusión dan origen a los diferentes tejidos y órganos del hongo. El micelio forma una comunidad de hifas en donde la célula inicial puede poseer esporas sexuales o asexuales o un

fragmento de micelio. El desarrollo micelial comienza por el crecimiento de células tubulares en ápices y por ramificaciones que eventualmente produce una colonia de células interconectadas. En condiciones de laboratorio, se definen diferentes parámetros de crecimiento relacionados con el incremento celular (tasa de elongación de la punta, sitio de ramificaciones, entre otras) (Moore 1998).

La estructura celular de los hongos es semejante a la mayoría de los eucariontes, donde sus organelos están delimitados por membranas: núcleo, mitocondrias, vacuolas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. El compartimiento de la punta de la hifa es rico en organelos, incluyendo una zona densa de mitocondrias y pequeñas vesículas membranosas a las cuales se les denomina grupo de vesículas apicales. La punta de la hifa también puede tener notables vacuolas, estas son pequeñas al inicio, pero se alargan progresivamente. En los compartimientos maduros, éstas pueden ocupar un gran volumen, restringiendo el núcleo y el resto del citoplasma hacia la zona periférica. En las hifas maduras el compartimiento puede estar vacío y la pared puede romperse por lisis enzimática. Usualmente el protoplasma y las reservas de energía almacenadas han sido retiradas de este compartimiento y movilizadas a otra parte del micelio (Téllez 2002).

Las vacuolas de los hongos poseen varias funciones, incluyendo el almacenar compuestos y el reciclamiento de metabolitos celulares. El sistema excretor lo constituye el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y vesículas. Este sistema implica el crecimiento de la punta y la secreción de enzimas para degradar nutrientes externos. La membrana plasmática es el límite entre lo que constituye la célula y el ambiente, ésta evita el paso del material celular hacia el ambiente y viceversa. La membrana plasmática es una estructura lipoproteica que separa a las células entre sí y del medio pero, esta separación no es completa ya que debe haber un intercambio entre el interior y el ambiente, liberando productos de excreción y absorbiendo nutrientes. La membrana plasmática y la pared celular forman un mecanismo fisicoquímico que regula la entrada de moléculas (Téllez 2002).

La pared celular define la forma de la hifa, le provee de fuerza mecánica para resistir la presión interna. La pared celular de muchos hongos filamentosos está compuesta

principalmente de polisacáridos, proteínas y lípidos. Consiste en una pared primaria interna compuesta de microfibrillas de quitina y una pared secundaria externa compuesta de glucanos. Esta se puede dividir en dos fracciones, una soluble en álcali la cual contiene α -glucanos, heteroglucanos y glicoproteínas y, la otra fracción es insoluble en álcali que contiene quitina, celulosa y β -glucanos. Estos componentes forman una red fibrilar que le proporciona a la pared dureza y forma (Téllez 2002).

1.5. Ascomicetos

Las especies de *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger* pertenecen a la clase de ascomicetos. Éstos tienden a producir dos o más tipos de esporas, unas de las cuales pueden ser meióticas. Estas se consideran esporas sexuales llamadas ascosporas. Estas etapas sexuales, llamadas teleomorfos, se reconocen taxonómicamente como miembros del phylum Ascomycota. Los mismos hongos pueden producir uno o más tipos de esporas asexuales, generalmente llamadas conidios o clamidiosporas, en las etapas denominadas anamorfos, que se han clasificado en un phylum independiente (Deuteromycota) (Chaverri y cols. 2003).

Los ascomicetos o Ascomycota constituyen un grupo monofilético dentro de la división eumicetes del reino Fungi con aproximadamente 64 000 especies conocidas. Representa el mayor filo de hongos y uno de los más diversos y ubicuos de los eucariontes (Conrad y cols. 2009). Habitan medios diversos como saprobios, parásitos y simbioses. Esta clase de hongos poseen enorme importancia científica, económica y práctica. El carácter esencial de estos hongos se debe a la formación de esporangios especiales característicos de su estado reproductivo sexual, llamados ascas o ascos, en cuyo interior se generan esporas denominadas ascosporas. Su talo puede ser unicelular aunque generalmente está constituido por un micelio bien desarrollado, con hifas ramificadas y septadas, cuyas células poseen de uno a varios núcleos. Los ascomicetos llevan a cabo una reproducción sexual y asexual. El estado de reproducción asexual o conidial se denomina anamorfo y al sexual o ascógeno se le denomina teleomorfo (Herrera y Uloa 1998).

En general, los hongos de la familia de los ascomicetos causan pudrición blanda. Los hongos causantes de la pudrición blanda utilizan un ataque similar al utilizado por los causantes de la

putredumbre marrón. Se degrada preferentemente la celulosa. Este tipo de hongos atacan la celulosa de las paredes celulares y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared secundaria celular (Schwarze y cols. 2000).

1.5.1. Morfología y estructura

Aunque el talo de algunos ascomicetos está reducido a una sola célula, como suceden en las levaduras, la mayoría tienen un micelio bien desarrollado, micro o macroscópico, con aspectos y coloraciones muy diversos. El micelio está formado por hifas septadas, delgadas o gruesas, simples o muy ramificadas, cortas o largas, las que por lo general se extienden en todos sentidos constituyendo micelios amorfos o con una forma regular y definida. Los septos de las hifas son discoidales y se forman a expensas de la pared lateral que se va cerrando hacia el centro. El cierre del tabique no es completo, pues en el centro queda un pequeño orificio de estructura sencilla, a través del cual generalmente se comunica el protoplasma de las células contiguas. En ciertos casos, el poro está obstruido por un tapón formado por corpúsculos, los que a su vez se originan en los cuerpos de woronin (cuerpos esféricos cristalinos, situados cerca de los septos) (Ingraham y cols. 1995).

En la gran mayoría de los ascomicetos, las hifas están estrechamente unidas formando prosénquimas, o bien pseudoparénquimas. Éstas representan estructuras que se observan en los cuerpos fructíferos, en los estromas y esclerocios (Ingraham y cols. 1995). Todas las células poseen pared celular, membrana celular, protoplasma y de uno a varios núcleos. La pared celular es delgada o gruesa y está constituida fundamentalmente por quitina, aunque presenta menores cantidades de celulosa, compuestos péptídicos, proteínas, lípidos y sales minerales. El protoplasma por lo común es hialino y transparente. Contiene vacuolas y reservas de grasa y glucógeno (Herrera y Uloa 1998).

1.5.2. Ciclo de vida, reproducción sexual y asexual (Fig. 2)

Los hongos ascomicetos representan el 75% de las especies fúngicas descritas hasta el momento. Sin embargo, las fases sexuales o teleomorfas han sido poco estudiadas debido a que solo se han podido recuperar en cultivo puro el diez por ciento de las especies. La principal dificultad en el estudio de estos organismos es que se necesita interrumpir el estado de latencia de las ascosporas. Con este fin se aplican diferentes métodos de aislamiento y de activación de ascosporas (Ingraham y cols. 1995).

El ciclo de vida de los ascomicetos comprende la formación de hifas dicarióticas que tiene lugar como consecuencia de diversos procesos de reproducción sexual que llevan al apareamiento de núcleos. Tales procesos de reproducción pueden ser: contacto gametangial, espermatización y somatogamia. En cualquier proceso de reproducción, una vez que el ascogonio está fecundado se empiezan a originar divertículos que pronto reciben copias de los núcleos paternos y maternos y los organizan en hifas dicarióticas, con un núcleo de cada tipo por célula. Estas células suelen crecer y ramificarse dentro de los tejidos del futuro ascoma, integrados por hifas monocarióticas. En las células situadas en el extremo de las numerosas ramificaciones de las hifas ascógenas tendrá lugar la cariogamia. Debido a la ramificación de las hifas dicarióticas, una sola fecundación inicial producirá un extenso número de cigotos, cada uno de los cuales actúa como una célula madre de un asca. El crecimiento de las hifas ascógenas se produce por uncinulación. Este es un proceso exclusivo de los ascomicetos en donde la primera célula dicariótica se curva apicalmente en forma de gancho (uncinulo) que se desarrolla en sentido opuesto al crecimiento. A la vez, se dividen ambos núcleos y uno de ellos emigra al uncinulo. Posteriormente, se separa por tabiques transversales el par apical de núcleos. Mientras tanto, el par apical del uncinulo se fusiona con la célula originada e introduce en ella el núcleo recibido. Este sistema de división celular se repite en cada célula apical hasta la formación del asco. Este mecanismo asegura que los núcleos hermanos se separen en dos células, y por lo tanto se mantiene el carácter dicariótico de dichas células. Las células apicales binucleadas (primordio del asco) completan la reproducción sexual con la cariogamia. Sus dos núcleos se fusionan para dar el núcleo cigótico y se convierte en un esporangio claviforme. A la célula diploide formada se le conoce como célula madre del asca.

Éstas sufren meiosis para originar cuatro núcleos haploides que se dividen por mitosis originando de esta forma los ocho núcleos haploides (Ingraham y cols. 1995).

Cada núcleo se delimita en una porción del citoplasma y el retículo endoplasmático llamado vesícula ascual que se va invaginando para formar las ascosporas. En los ascomicetos, las ascas se forman protegidas por hifas monocarióticas derivadas de las que rodean el ascogonio, constituyendo los cuerpos fructíferos llamados ascomas o ascocarpos. En el proceso de formación de las ascosporas, los ascomicetos suelen expulsar a las esporas de forma activa por una abertura apical. Estas ascosporas pueden ser elipsoidales o fusiformes, a veces alargadas, unicelulares o pluricelulares, hialinas o con melanina. Cuando las ascosporas caen sobre un medio adecuado, absorben agua, se hinchan y germinan. Esto ocurre por la acción del material sintetizado en el retículo endoplásmico como la quitina y los glucanos (necesarios para la formación de la pared). Estos compuestos son enviados a los dictiosomas a través de vesículas. En los dictiosomas ocurre la transformación del material a membrana plasmática, enzimas de síntesis de la pared o ablandamiento. Posteriormente, estas vesículas son transportadas al tubo de germinación en donde se unen a la membrana donde liberan su contenido, aumentando la pared. La elongación sufrida en el ápice del tubo de germinación se debe a la presión ejercida por el protoplasto o presión osmótica interna. Por esta razón, las hifas solo crecen en longitud, pero no poseen preferencia de dirección, lo que da lugar a colonias radiales o esféricas dependiendo del sustrato en el que se encuentre el hongo. De esta manera, comienza el crecimiento del micelio haploide (Ingraham y cols. 1995, Madigan y cols. 2005).

La forma de reproducción asexual en los ascomicetos se da por conidios. Éstos suelen formarse en las etapas más favorables de su ciclo vital, dando lugar a la fase anamórfica. El proceso de formación de los conidios puede ocurrir por diferentes mecanismos. El mecanismo más frecuente en la formación de los conidios se da por la existencia de células especializadas llamadas conidiógenas que suelen ser sostenidas por conidióforos. En ellos, se produce conidiogénesis blástica, que implica la formación de nueva pared, de tal forma que el talo crece con la punta de forma redondeada. Los conidios pueden ser uni o pluricelulares, hialinos u oscuros, de pared lisa u ornamental. Los conidióforos se pueden formar directamente sobre el micelio o agrupados (Ingraham y cols. 1995, Kendrick 1985).

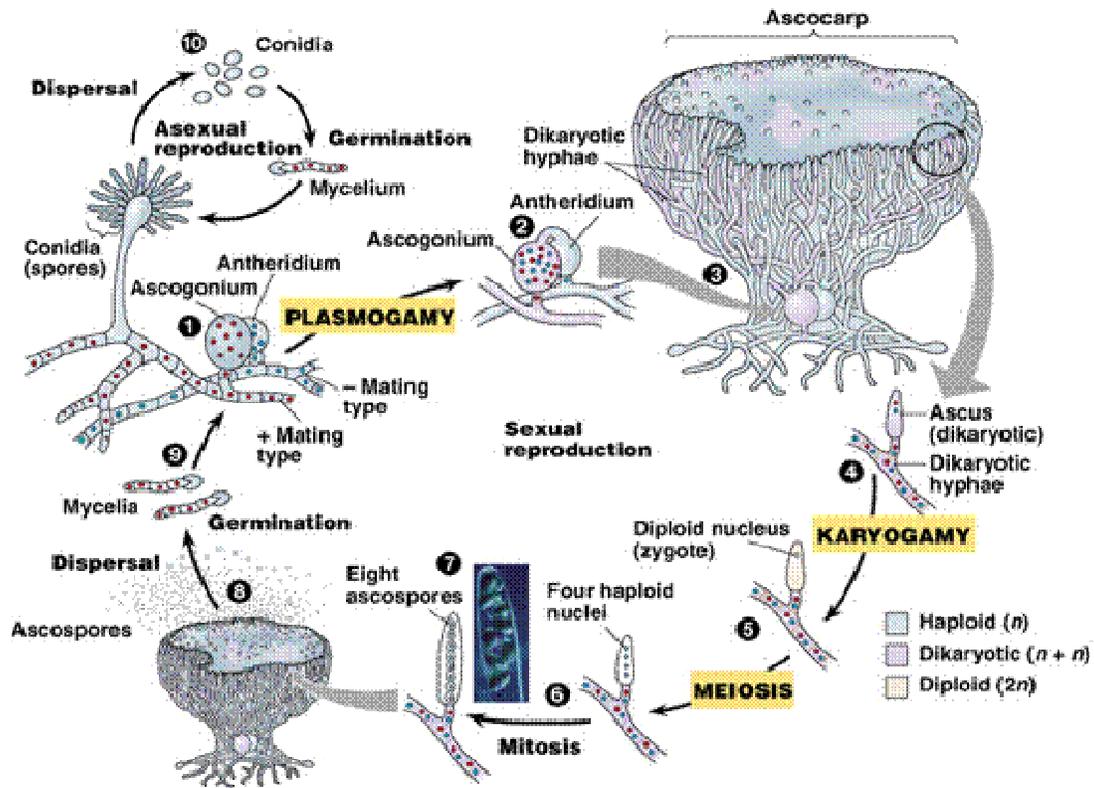


Fig. 2 Ciclo de vida de los ascomicetos

1.5.3. Sistema enzimático

Muchos ascomicetos (particularmente el género *Aspergillus* y *Trichoderma*) presentan un sistema enzimático xilanolítico. Estas enzimas (en su mayoría extracelulares) se enlistan a continuación (Chávez 2006).

- Endoxilanasas: hidrolizan al azar la cadena principal de xilano produciendo una mezcla de xilo-oligosacáridos.
- β -xilosidasas: liberan xilosa de oligosacáridos cortos.
- α -L-arabinofuranosidasas: remueve cadenas laterales de L-arabinofuranosa.
- α -D-glucoronidasas: hidrolizan los residuos de glucoronato de metilo.
- Acetilxilanesterasas: hidrolizan grupos acetatos de la cadena principal.
- Ferulil y cumaril esterases: hidrolizan los ácidos aromáticos respectivos unidos a residuos arabinofuranósidos.

En este trabajo, se utilizaron las cepas de *Aspergillus niger*, *Neurospora* sp e *Hypocrea lixii*. Éstas se identificaron con base en el análisis de comparación de las secuencias mediante PCR de ITS (Cuamatzi 2011).

1.6. Microorganismos de interés

1.6.1. *Neurospora* sp

El género de *Neurospora* sp. se utiliza como un organismo modelo porque es fácil de cultivar y tiene un ciclo de vida haploide que los hace simples para análisis genéticos, ya que los rasgos recesivos se mostraran en la descendencia. El análisis de la recombinación genética es facilitado por la disposición ordenada de los productos de la meiosis en *Neurospora* (ascosporas). La totalidad de genoma de siete cromosomas ha sido secuenciada (Ingraham y cols. 1995).

En *Neurospora* sp la pared celular de la región madura presenta al menos cuatro zonas concéntricas (capas). La zona externa consiste de glucanos con enlaces β (1-3) y β (1-6), los cuales son degradados por laminarinasas, la capa siguiente tiene un sistema de glicoproteínas embebidas en una matriz de proteínas, la otra es una capa de proteínas y la región interna tiene microfibrillas embebidas en proteínas (Téllez 2002).

1.6.2. *Hypocrea lixii*

Los hongos de la familia *Hypocreaceae* sólo se conocen por sus anamorfos y permanecen ajenos a los teleomorfos conocidos. Estos anamorfos incluyen al género cosmopolita *Trichoderma*. Las filogenia molecular ha demostrado conexiones anamorfo-teleomorfo en este grupo (Kuhls y cols. 1996, Chaverri y cols. 2001, Dodd y cols. 2002), demostrando que *H. lixii* es el teleomorfo de la especie *Trichoderma harzianum* (Papavizas 1985).

Los ascomicetos del orden de los Hypocreales y sus anamorfos incluyen hongos de importancia económica que van desde patógenos virulentos de plantas hasta efectivos agentes de control biológico (tales como *H. lixii*) contra varias enfermedades de cultivos, hortalizas y frutas (Harman y cols. 2004).

Este hongo puede utilizar casi cualquier compuesto orgánico y/o nutriente debido a su enorme complejo de enzimas líticas. Sus materiales orgánicos constan de una amplia gama de azúcares heteropolisacáridos (Scherer 2007).

1.6.3. *Aspergillus niger*

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen inhibición de la germinación de las semillas. El color es la principal característica macroscópica para su identificación. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Kozakiewicz 1989).

Aspergillus niger es un ascomiceto filamentoso ubicuo para el ambiente. Éste se ha implicado en infecciones oportunistas en humanos. *A. niger* es conocido ampliamente como productor de ácido cítrico. La fermentación de este hongo se ha utilizado como modelo de dicho proceso. En la naturaleza, este hongo desempeña un papel importante ya que participa en el ciclo del carbono debido a que las enzimas hidrolíticas y oxidativas que posee contribuyen en la degradación ligninocelulolítica de las plantas. Además, se ha observado que *A. niger* es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de glucanasas que pueden degradar completamente la celulosa. Estas enzimas se han utilizado en diversos procesos industriales como bioblanqueo, extracción y clarificación de jugos, elaboración de alimento animal, entre otros (Villena y cols. 2003).

Por lo tanto, *A. niger* muestra ventajas para la producción industrial de enzimas: tiene un alto nivel de producción industrial, presenta buenas propiedades para el cultivo, sus productos generalmente son considerados seguros, lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales (Villena y cols. 2003).

1.6.4. *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria entérica que se caracteriza fenotípicamente por ser un bacilo recto gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Se adapta fácilmente y cuenta con procesos que confiere a la célula la capacidad de probar su ambiente y moverse a regiones más favorables para su metabolismo (Padilla 2003).

Este microorganismo es no esporulado, móvil por flagelos peritricos, anaerobio facultativo, oxidasa negativo y normalmente reduce nitratos a nitritos. Puede crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias, catabolizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden usar urea ni citratos. La temperatura de crecimiento óptima es de 35-40°C, es quimioheterótrofo y se reproduce por fisión binaria. Pueden crecer en un rango de pH de 5 a 8 (Madigan y cols. 2005, Ingraham y cols. 1998, Padilla 2003).

E. coli forma parte de la flora normal habitual en el tracto digestivo de humanos, sin embargo, existen algunas cepas patógenas causantes de diarrea. Éstas se dividen en seis categorías principales de acuerdo a sus diferentes mecanismos de patogenicidad, su interacción con la mucosa intestinal, síntomas diarreicos y características epidemiológicas. Estas cepas son la enteropatigénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAaggEC), enterotoxigénica (ETEC) y difusiva-adherente (DAEC) (Nataro y Kaper 1998).

2. ANTECEDENTES

Se han llevado a cabo diversos estudios acerca de los ftalatos. Hashizume y cols. (2002) estudiaron particularmente el DBF y DEHF. Estos investigadores encontraron a estos compuestos en varias muestras de agua del río Tempaku (Yagotoyama, Japón). De las ocho cepas estudiadas del río Tempaku, tres de ellas (R1, R7 y D1) no degradaron DMP, pero mostraron habilidad para degradar otros ftalatos. En las pruebas de degradación de ftalatos se encontró que se degradó aproximadamente el 100% de DEHF, di-isobutil ftalato (DIBF) y DBF, mientras que solo degradó alrededor del 70% de DEHF. Las cepas de *Acitenobacter lwoffii* R1-R3 y D1 mostraron una alta capacidad de degradación de DBF.

Tanaka (2000) observó la degradación de DBF por la enzima lipasa de *Candida cylindracea* en un pH de 7. El producto de degradación (BF) fue detectado por HPLC en 24 horas. La concentración de éste disminuyó en tres días y se degradó en ácido ftálico.

Por otro lado, Patrauchan y cols. (2005) realizaron estudios genómicos y proteómicos para investigar el catabolismo de los ftalatos y benzoatos en *Rhodococcus sp.* (actinomiceto degradador de bifenilos policlorados). Esta cepa fue aislada de suelo contaminado y mostró habilidad para degradar de manera aerobia los bifenilos policlorados (PCBs). La mencionada cepa utilizó el benzoato y ftalato como fuente de carbono y energía.

Wang y cols. (2000) estudiaron la degradación de dimetil tereftalato (DMTF) empleando las bacterias *Variovorax paradoxus* y *Sphingomonas yanoikuyae*. Éstas se aislaron de sedimentos de la profundidad del océano del Mar del Sur de China. Las cepas de *S. yanoikuyae* mostraron una alta capacidad de degradación de DMTF a monometil tereftalato (MMTF). Por otro lado las cepas de *V. paradoxus* mostraron habilidad de utilizar DMTF como única fuente de carbono y de energía.

Méndez y cols. (2007) estudiaron 20 cepas de hongos aislados de rellenos sanitarios capaces de degradar polietileno. La actividad biodegradadora la determinaron con la técnica de Kavelman y Kendrick a temperatura de 20 y 30° C y a pH 4.5-8.0. La cepa que degradó con mayor eficiencia fue *Aspergillus flavus*.

En la degradación de DBF por *Polyborus brumalis*, se observó crecimiento micelial a los 12 días a tres diferentes concentraciones (250, 750 y 1250 μM). En la concentración de 1250 μM se observó un ligero crecimiento. El Dietil ftalato y monobutil ftalato fueron detectados como intermediarios en la degradación de DBF. La concentración de ambos ftalatos decreció rápidamente después de 12-15 días de incubación. El principal producto de degradación resultó ser el ácido ftálico anhidro. La tasa de degradación de DBF se determinó por HPLC y los productos de degradación del DBF se determinaron por GC/MS (Lee y cols. 2007).

En otra investigación se observó la degradación de DBF en un biorreactor utilizando células inmovilizadas de *Bacillus* sp. Este microorganismo se aisló de lodos activados. A las 33 horas se logró la completa eliminación del compuesto cuando la concentración fue de 18mg/l. En una segunda prueba se utilizó una concentración de 22 mg/l. Se obtuvo la completa degradación de DBF en 12 horas. Estos estudios muestran que las células inmovilizadas de *Bacillus* sp se adaptan rápidamente al DBF debido a que se observó crecimiento microbiano y acumulación de biomasa (Xiaoran 2007).

Se ha investigado la degradación de DEF, DMF y DBF empleando *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *Polyporus brumalis*, *Merulius tremellosus*, *Trametes versicolor* y *T. versicolor*. Éstos mostraron una alta capacidad de degradar la mayoría de los ftalatos después de incubarse por 12 días. Las cepas de *Pleurotus ostreatus* mostraron la mayor velocidad de degradación de los tres ftalatos probados. De éstos DBF fue degradado con más rapidez por todas las cepas estudiadas (Hwang y cols. 2008).

Por otra parte, las cepas de hongos aislados de suelo y desarrollados sobre DEHF mostraron producción de biomasa después de 20 días de fermentación conteniendo 50 μl de DEHF como única fuente de carbono y energía por 50 ml de medio de cultivo (Sánchez y cols., 2009).

Recientemente, se encontró que cepas aisladas de una productora de papel fueron capaces de crecer en DEHF. Se observó crecimiento de las cepas en medio sólido a dos concentraciones diferentes de DEHF: a 500 y 1000 mg/l de medio de cultivo (Cuamatzi 2011).

En general, la degradación de ftalato consiste en dos procesos: la biodegradación primaria de los ésteres de ftalato y monoésteres de ftalato a ácido ftálico. Éste se degrada posteriormente a CO₂ y/o CH₄ (Staples y cols. 1997).

Kim y cols. (2002) utilizaron la bacteria *E. coli* para estudios de degradación de DEHF. Se investigó la eficacia de dos enzimas lipolíticas: cutinasa y esterasa. Cuando se usó la cutinasa cerca del 90% de DEHF fue degradado dentro de las primeras 12 horas de incubación. Por el contrario, usando la misma concentración de esterasa cerca del 85% de DEHF aun permanecía en el medio de cultivo después de tres días de tratamiento. En esta investigación se encontró que en ambos procesos enzimáticos se formó rápidamente 1,3-isobenzofurandiona (IBF) por la hidrólisis del grupo éster del DEHF. Los efectos tóxicos de los productos de degradación se evaluó usando la bacteria recombinante *E. coli*. En el proceso enzimático utilizando esterasa se forma el componente X que se cree causa un estrés celular significativo. Comparando ambas enzimas, se encontró que la cutinasa mostró una actividad específica superior en la hidrólisis de éster. En la degradación de DEHF y BBF, la cutinasa fúngica produjo el IBF que no fue tóxico para la bacteria.

En esta investigación se estudió el crecimiento de cepas de hongos aislados del proceso de reciclado de una industria productora de papel en DBF. Así como la evaluación de la toxicidad del sobrenadante resultante de la fermentación líquida de las cepas de hongos crecidas sobre diferentes medios de cultivo conteniendo ya sea 500 o 1000 mg/l de DBF después de 21 días de crecimiento de dichas cepas.

3. JUSTIFICACIÓN

El DBF es un contaminante del medio ambiente y tóxico para el humano. Existen muy pocos estudios sobre la degradación de ftalatos empleando hongos, así como sobre la toxicidad de los compuestos obtenidos después del crecimiento de los hongos en estos contaminantes. Por lo que en este trabajo se estudiará el crecimiento de *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger* en DBF con el objeto de determinar si estas cepas emplean este compuesto como fuente de carbono y energía y si los compuestos generados después de la fermentación líquida son tóxicos.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de hongos aisladas previamente (*Neurospora* sp, *Hypocrea lixxi*, *Aspergillus niger*) de la industria productora de papel serán capaces de crecer utilizando DFB como fuente de carbono y energía

No se presentará un efecto tóxico del sobrenadante obtenido de la fermentación líquida de las cepas de hongos crecidos sobre los diferentes medios de cultivo en el desarrollo de la cepa de *E. coli*

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el crecimiento de cepas de hongos aisladas del proceso de reciclado de una industria productora de papel utilizando DBF y evaluar la toxicidad de los compuestos obtenidos después del crecimiento de estos organismos en fermentación líquida.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la velocidad de crecimiento radial de hongos aislados del proceso de reciclado de una industria productora de papel crecidos en dos concentraciones de DBF (500 y 1000 mg/l)
- Determinar la velocidad de crecimiento específica de hongos aislados del proceso de reciclado de una industria productora de papel crecidos en dos concentraciones de DBF (500 y 1000 mg/l)
- Determinar la toxicidad del sobrenadante de los cultivos mediante la evaluación de la viabilidad de *E. coli*.

6. METODOLOGÍA

Las cepas utilizadas en este estudio fueron la cepa de *Neurospora sp* (aislada de la etapa de pulpeo), *Hypocrea lixii* (aislada del agua residual) y *Aspergillus niger* (aislada de la etapa de papel hidratado con biocida).

6.1. Velocidad de crecimiento radial (V_r)

La V_r de las cepas aisladas se evaluó en tres medios de cultivo diferentes: 1) medio sin adición de DBF, 2) medio de cultivo con 1000 mg/l de DBF y, 3) medio de cultivo con 500 mg de DBF/l respectivamente. El medio sin ftalato se preparó por litro de agua con 1.0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de MgSO_4 , 0.3 g de $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)$, 0.02 g de FeSO_4 , 0.02 g de ZnSO_4 , 0.02 g de MnSO_4 y 20 g de agar bacteriológico. El medio de DBF se preparó con los mismos reactivos del medio sin ftalato más 1000 y 500 mg de DBF/ l de medio de cultivo respectivamente. Para la concentración de 1000 mg de DBF/l se agregó 0.56 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Asimismo, para la concentración de 500 mg de DBF/ se le añadió 0.28 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para determinar la V_r se añadió 50 ml de medio cultivo a cada caja Petri utilizada.

El avance radial diario del micelio se determinó en la fase exponencial de crecimiento del hongo, y se empleó la ecuación lineal para el procesamiento de los datos donde la pendiente corresponderá a la V_r . Los datos obtenidos se reportaron en mm de avance radial micelial por hora. Al final del avance radial del micelio se calculó la biomasa. Ésta se valoró por el método del peso seco. El micelio completo junto con el agar contenido en la caja Petri se vació a un matraz de 50 ml. Posteriormente, se calentó en el autoclave a 60°C por 15 minutos hasta que el agar se hizo líquido. Después, el micelio se filtró en un papel filtro previamente pesado y se puso a secar durante 24 horas a 80°C hasta obtener un peso constante. Transcurrido el tiempo, se pesó el papel filtro con la biomasa seca y por diferencia de peso se determinó la biomasa obtenida al final del avance radial en mg/ml (Reeslev y cols. 1995).

6.2. Velocidad específica de crecimiento (μ)

Para determinar la μ , cada una de las cepas se desarrollaron por separado en matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo: 1) medio sin adición de DBF, 2) medio de cultivo con 1000 mg/l de DBF y, 3) medio de cultivo con 500 mg de DBF/l respectivamente. El medio sin ftalato se preparó por litro de agua con 1.0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de MgSO_4 , 0.3 g de $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)$, 0.02 g de FeSO_4 , 0.02 g de ZnSO_4 y 0.02 g de MnSO_4 . El medio de DBF se preparó con los mismos reactivos del medio sin ftalato más 1000 y 500 mg de DBF/ l de medio de cultivo respectivamente. Para la concentración de 1000 mg de DBF/l se agregó 0.56 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Asimismo, para la concentración de 500 mg de DBF/ se le añadió 0.28 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Los matraces se inocularon con un fragmento de micelio de 10 mm de diámetro. Se incubaron a 25 °C por 21 días a 200 rpm. Se retiraron tres matraces cada veinticuatro horas. La biomasa se separó por filtración y se puso a secar en un horno a 60 °C hasta obtener peso constante. Antes de determinar la velocidad específica de crecimiento se determinó el pH de cada matraz retirado a lo largo de los 21 días de fermentación. La μ se determinó en la fase exponencial de crecimiento del hongo, y se empleó la ecuación lineal para el procesamiento de los datos donde la pendiente corresponderá a la μ .

6.3. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias

Para determinar la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida se utilizó agar R2A (específico para bacterias) y 47.3 ml del sobrenadante obtenido después de la filtración de la biomasa de los cultivos líquidos empleados para determinar la μ . Los medios de cultivo se inocularon con 4.63×10^9 colonias de *E. coli*. Los medios de cultivo se incubaron a 37 °C por 24 horas. El desarrollo de colonias se cuantificó con un procesador de imágenes. Asimismo, se llevo a cabo el análisis estadístico de los resultados.

6.4. Determinación de la CI₅₀ de DBF

6.4.1. Preparación del inóculo para la determinación de la CI₅₀ del plastificante

Se tomó una colonia de la cepa de *E. coli*. Se inoculó en caldo de soya tripticaseína durante 24 horas a 37°C. Después de este tiempo de incubación, se tomó con un asa bacteriológica una parte del inóculo líquido y se sembró por estriado en una caja Petri con Agar Eosina Azul de Metileno (agar selectivo de *E. coli*). Se incubó durante 24 horas a 37°C y se refrigeró para mantener la cepa pura de la bacteria.

6.4.2. Medios de cultivo para la determinación de CI₅₀ de DBF

Para la realización de la curva estándar de ftalato se prepararon diferentes medios de cultivo. Éstos contenían diferentes concentraciones de DBF: agar R₂A (específico para bacterias) con 0, 200, 500, 700, 1000 y 1200 mg/l de DBF respectivamente. Para cada medio de cultivo se ajustó el pH a 6.5, se esterilizó y se enfrió a 37°C. Cuando se alcanzó la temperatura indicada se agregó el ftalato.

6.4.3. Determinación de la curva estándar de DBF y de la CI₅₀

Se tomó una colonia pura de la placa de *E. coli* con una asa bacteriológica y se sembró en un tubo que contenía 3 ml de caldo de soya tripticaseína + 2% de sacarosa. Se incubó durante 24 horas a 37°C en baño maría. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 2.5 ml del inóculo y se colocó en un tubo vacío estéril. Posteriormente, se realizó una serie de diluciones hasta 10⁻⁸. Se sembraron 4.63 E+9 colonias de *E. coli* en la caja de petri estéril y se agregó el agar con las diferentes concentraciones de ftalato a 37°C. Se mantuvo en agitación vertical y horizontal la caja petri hasta que solidificó el agar. Se incubó durante 24 horas a 37°C. Después del tiempo de incubación se contaron las colonias empleando un procesador de imágenes. Para calcular la CI₅₀ se graficó la concentración de DBF y el porcentaje de mortalidad de bacterias. Se transformó la concentración a la función Log concentración y el porcentaje de la mortalidad se transformó a unidades probit (Monje 2007) utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5 ©. Las unidades probit representan unidades de

desviación estándar incrementadas en cinco con la finalidad de evitar el uso de números negativos. Esta transformación asume que la respuesta de los individuos se distribuye en forma normal, correspondiendo la curva de respuesta a una de función de distribución normal (Criado y Muñiz 1978). Esta curva normal tiene una media de 5, valor que corresponde a un umbral proporcional de respuesta del 50% (Infante y Calderón 1994). Con los datos obtenidos se determinó la CI_{50} utilizando la ecuación de la línea recta, donde $y=DL_{50}$. Se estima con el modelo calculado el valor para un 50% de mortalidad. En unidades Probit 50% corresponde a 5 (Monje 2007).

6.5. Determinación del grosor de la pared y diámetro de las hifas de la ZJ y ZM de las cepas de *Neurospora sp*, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*

Para diferenciar la zona joven (ZJ) de la zona madura (ZM) se utilizaron colonias de *Neurospora sp*, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger* de siete días de desarrollo en tres diferentes medios de cultivo sólidos: 1) medio sin adición de DBF, 2) medio de cultivo con 1000 mg/l de DBF y, 3) medio de cultivo con 500 mg de DBF/l respectivamente. El medio sin ftalato se preparó por litro de agua con 1.0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $MgSO_4$, 0.3 g de $CaH_4(PO_4)$, 0.02 g de $FeSO_4$, 0.02 g de $ZnSO_4$, 0.02 g de $MnSO_4$ y 20 g de agar bacteriológico. El medio de DBF se preparó con los mismos reactivos del medio sin ftalato más 1000 y 500 mg de DBF/ l de medio de cultivo respectivamente. Para la concentración de 1000 mg de DBF/l se agregó 0.56 gr de $(NH_4)_2SO_4$. Asimismo, para la concentración de 500 mg de DBF/ se le añadió 0.28 gr de $(NH_4)_2SO_4$. Estas colonias se tiñeron con azul de toluidina al 0.1%. El reactivo se colocó sobre la colonia y después de veinte minutos se retiró, lavando el exceso con agua destilada. Posteriormente, se midieron las zonas diferenciadas ZJ y ZM utilizando un procesador de imágenes.

6.6. Determinación del grosor de la pared de la hifa y el diámetro de las hifas del sobrenadante de la fermentación líquida de las cepas de *Neurospora sp*, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*

Para determinar el grosor de la pared de la hifa y el diámetro de las hifas de las tres cepas de hongos utilizadas se tomaron muestras de los 21 días de fermentación del sobrenadante

obtenido después de la filtración de la biomasa de los tres diferentes medios de cultivos líquidos que fueron empleados para la determinación de la velocidad de crecimiento específica y se midió el grosor de la pared de la hifa y el diámetro de las mismas utilizando el procesador de imágenes.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de la velocidad de crecimiento radial de las tres cepas de hongos aisladas de la industria productora de papel

La cepa de *Neurospora sp* e *Hypocrea lixii* invadieron la caja Petri a las 42 horas de incubación. Para la cepa de *Aspergillus niger* fue a las 64 horas de su incubación.

Para la cepa de *Neurospora sp* se observó una velocidad radial menor en el medio sin adición de DBF y mayor en el medio de 500 mg/l de DBF. Por el contrario, la cepa de *Hypocrea lixii* mostró una velocidad radial menor para el medio de 1000 mg/l de DBF y mayor Vr en el medio sin adición de DBF. En el caso de la cepa de *Aspergillus niger* mostró mayor Vr en el medio de 500 mg/l de DBF y menor Vr en el medio sin adición de DBF (Tabla 1).

Para las tres cepas estudiadas se realizaron análisis estadístico. Se empleó una prueba de ANOVA de una sola vía. La variable independiente fue la Vr y los medios de cultivo fueron el factor de tres niveles (1000 mg/l DBF, 500 mg/l DBF y sin adición de ftalato).

Para el caso de la cepa de *Neurospora sp* se observó que no existe una diferencia significativa de la Vr entre los medios de cultivo de 1000 y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$). Por el contrario para los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato; así como para el medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato se observó una diferencia significativa ($P<0.0001$).

Para el caso de la cepa de *Hypocrea lixii* se observó que no existe una diferencia significativa de la Vr entre los medios de cultivo de 1000 y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$). Por el contrario para los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato; así como para el medio de 500 mg/l Para la cepa de *Hypocrea lixii*, se observo que no existe una diferencia significativa de la Vr en los tres medios de cultivo utilizados ($P=0.1717$)

Por otro lado, para la cepa de *Aspergillus niger* se observó diferencia significativa entre los tres medios de cultivo ($P<0.0001$) con respecto a la Vr.

Tabla 1. Vr (mm/h) de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	1.065 ^a (0.017)	1.318 ^b (0.015)	1.309 ^b (0.003)
<i>Hypocrea lixii</i>	0.742 ^a (0.019)	0.555 ^b (0.005)	0.573 ^b (0.001)
<i>Aspergillus niger</i>	0.327 ^a (0.003)	0.715 ^b (0.015)	0.685 ^c (0.005)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Por otro lado, se evaluó la cantidad de la biomasa producida después de que la caja petri había sido invadida por el sustrato de las tres cepas de hongos aislados previamente de la industria productora de papel, lo cual es un indicador del consumo del DBF. Como se observa en la Tabla 2, en la cepa de *Neurospora sp* se obtuvo menor biomasa en el medio sin adición de ftalato. Asimismo, se observó mayor biomasa en el medio de 1000 mg/l de DBF en comparación con el de 500 mg/l. Aunque la diferencia entre los tres medios de cultivo con respecto a la biomasa obtenida al final del avance radial no resultó significativa ($P = 0.1649$).

En el caso de la cepa de *Hypocrea lixii* se observó mayor biomasa en el medio sin adición de DBF. En el medio de 1000 mg/l de DBF se obtuvo menor biomasa que en el de 500 mg/l de DBF. En general, la diferencia entre los tres medios de cultivo con respecto a la biomasa obtenida no es significativa ($P = 0.3819$).

En el caso de la cepa de *Aspergillus niger* se observó mayor biomasa en el medio de 500 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo. En el medio de 1000 mg/l de DBF se observó mayor biomasa en comparación con el medio sin adición de ftalato. La diferencia entre los tres medios de cultivo con respecto a la biomasa obtenida no resulto significativa ($P=0.3173$).

Tabla 2. Biomasa (mg/ml) obtenida al final del avance radial de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	0.0573 ^a (0.030)	0.1073 ^a (0.045)	0.1133 ^a (0.022)
<i>Hypocrea lixii</i>	0.1593 ^a (0.023)	0.0820 ^a (0.001)	0.0613 ^a (0.030)
<i>Aspergillus niger</i>	0.1227 ^a (0.042)	0.1223 ^a (0.118)	0.1327 ^a (0.116)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P<0.05$)

7.2. Evaluación de la velocidad específica de crecimiento y pH de la fermentación líquida de las tres cepas de hongos aisladas de la industria productora de papel

Como se muestra en la Tabla 3, para la cepa de *Neurospora* sp se observó una μ mayor en el medio sin adición de ftalato en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, se observó mayor μ en el medio de 500 mg/l de DBF en comparación con el medio de 1000 mg/l de DBF. Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que no existe una diferencia significativa de la μ entre los tres medios de cultivo utilizados ($P=0.0822$).

En el caso de *Hypocrea lixii* se observó una μ mayor en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, se observó mayor μ en el medio sin adición de ftalato en comparación con el medio de 500 mg/l de DBF. Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que no existe una diferencia significativa de la μ entre los tres medios de cultivo utilizados ($P=0.2673$).

Para la cepa de *Aspergillus niger*, se observó una μ mayor en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, se observó mayor μ en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF en comparación con el medio sin adición de ftalato. Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que no existe una diferencia significativa de la μ entre los medios conteniendo 1000 y 500 mg/l de DBF respectivamente ($P>0.05$). Con respecto a los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato si se observó diferencia significativa. Asimismo, para los medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0014$).

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	0.0036 ^a (0.0003)	0.0034 ^a (0.0004)	0.0025 ^a (0.0006)
<i>Hypocrea lixii</i>	0.0055 ^a (0.0007)	0.0048 ^a (0.0008)	0.0060 ^a (0.0009)
<i>Aspergillus niger</i>	0.0014 ^a (0.00005)	0.0050 ^b (0.0007)	0.0039 ^b (0.0008)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Con respecto al pH, para la cepa de *Neurospora* sp en el medio de 1000 mg/l de DBF el pH inicial fue de 6.38 y el pH final fue de 3.73 (en el día 21 de la fermentación líquida). Para el medio de 500 mg/l de DBF, el pH inicial fue de 6.48 y el pH final se determinó en 2.65. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 4.60 y el pH final fue de 2.72 (Fig. 3)

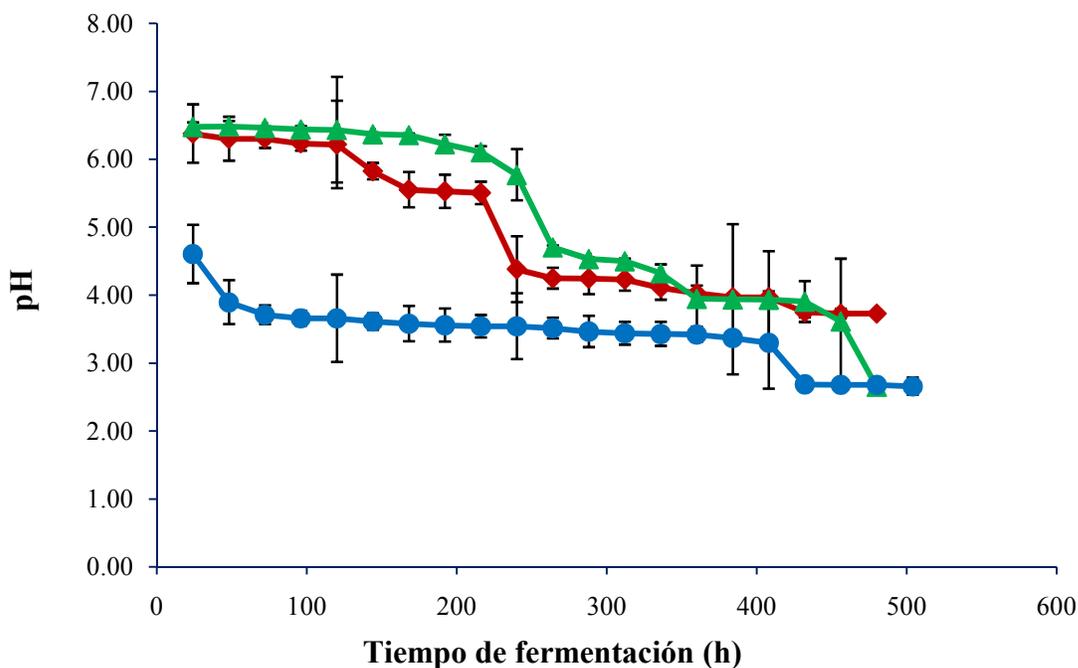


Fig. 3. pH del sobrenadante de los cultivos durante el tiempo de fermentación líquida de *Neurospora* sp desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (♦), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

Para la cepa de *Hypocrea lixii*, se observó que en el medio de 1000 mg/l de DBF el pH inicial fue de 6.00 y el pH final fue de 3.93 (en el día 21 de la fermentación líquida). Para el medio de 500 mg/l de DBF el pH inicial fue de 6.41 y el pH final se determinó en 4.97. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 4.60 y el pH final fue de 3.30 (Fig. 4).

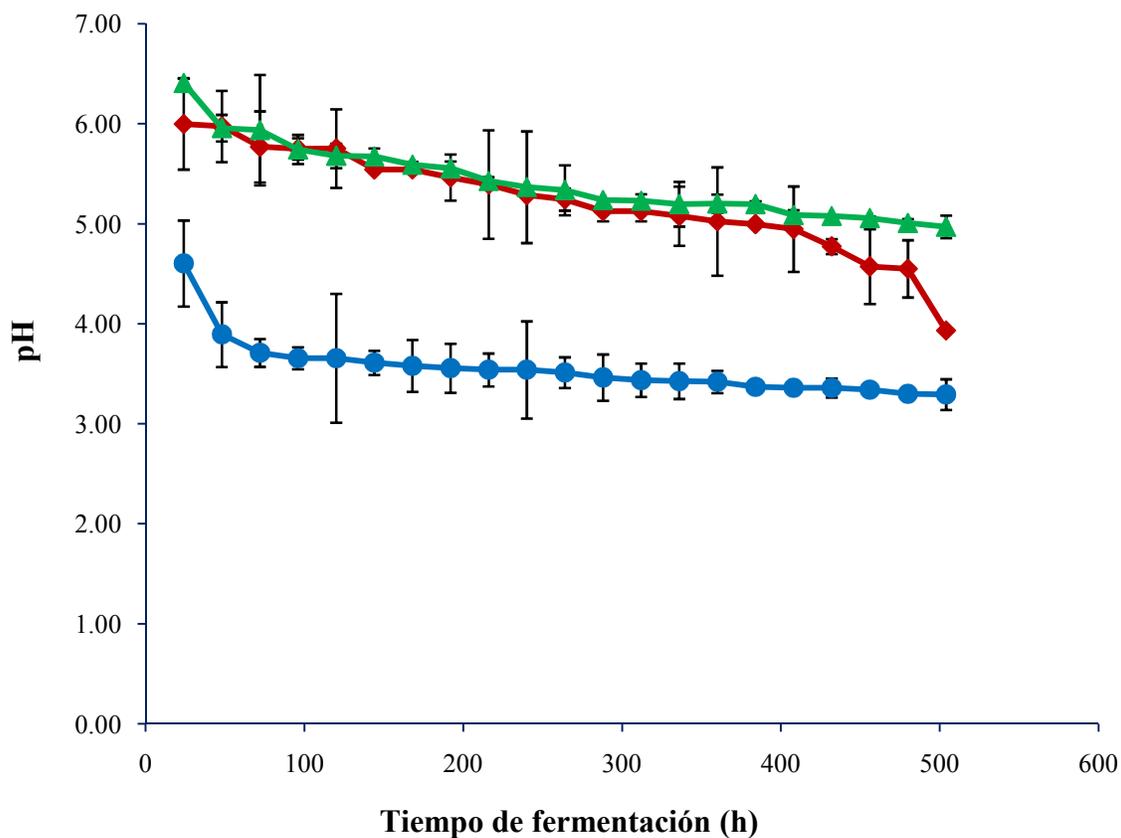


Fig. 4. pH del sobrenadante de los cultivos durante el tiempo de fermentación líquida de *Hypocrea lixii* desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (♦), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

Con respecto al pH de la cepa de *Aspergillus niger*, en el medio de 1000 mg/l de DBF el pH inicial fue de 5.98 y el pH final fue de 3.58 (en el día 21 de la fermentación líquida). Para el medio de 500 mg/l de DBF el pH inicial fue de 6.32 y el pH final se determinó en 4.25. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 5.31 y el pH final fue de 2.46 (Fig.5).

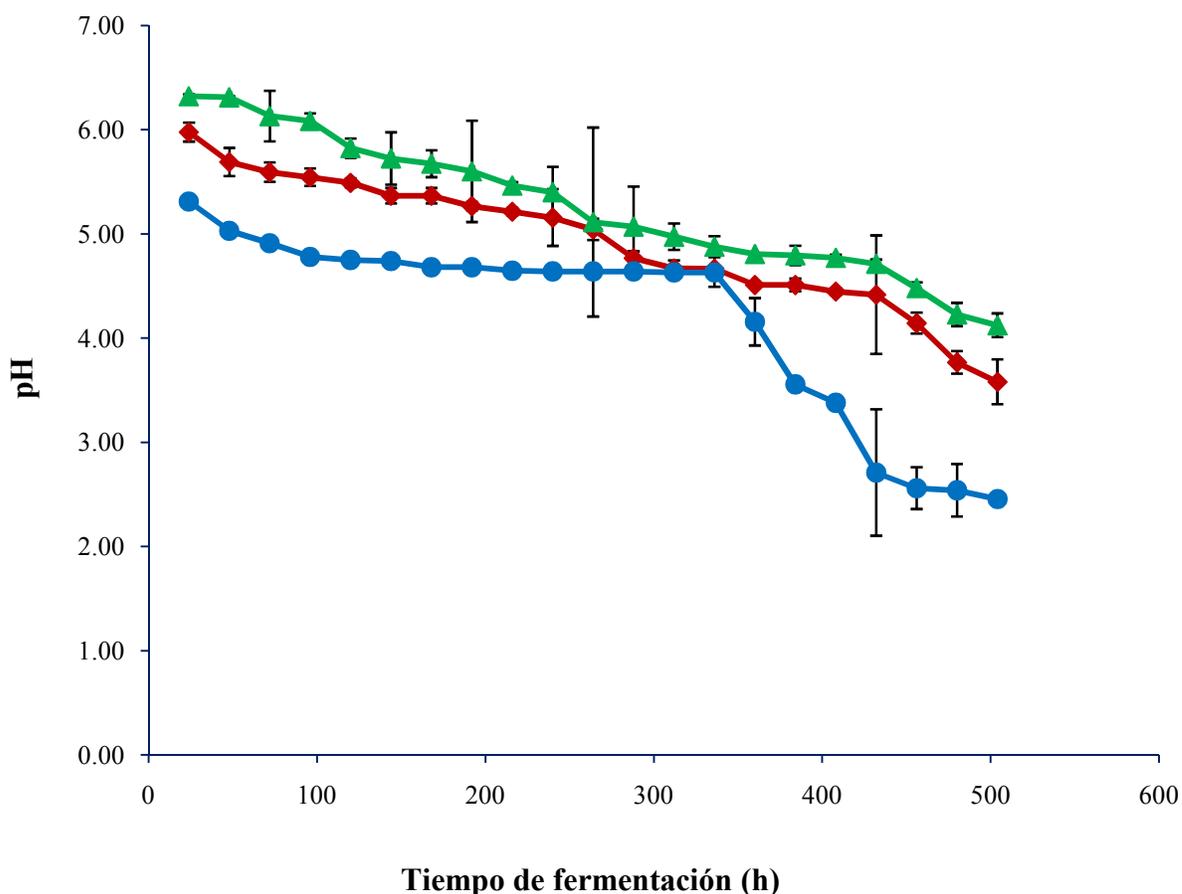


Fig.5. pH del sobrenadante de los cultivos durante el tiempo de fermentación líquida de *Aspergillus niger* desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (♦), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

7.3. Realización de la curva estándar de DBF y determinación de la CI₅₀

En la tabla cuatro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) en una dilución 10⁴ obtenidas por ml. Se observa que en el medio utilizado (agar R2A) las UFC/ml disminuyen conforme aumenta la concentración de ftalato. Es decir, en la concentración más alta de ftalato (1200 mg/l DBF) contamos menos colonias por ml que en la menos concentrada (200 mg/l DBF).

Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (10⁹)/ml obtenidas en agar R2A conteniendo diferentes concentraciones de DBF

Medio de cultivo	Concentración de DBF (mg/l)					
	0	200	500	700	1000	1200
R₂A	4.63	3.58	2.41	2.05	1.14	0.46

Después de obtener las UFC/ml en las diferentes concentraciones de DBF utilizadas, convertimos los datos de concentración de DBF al log de la concentración y el porcentaje de la mortalidad de bacterias lo transformamos a unidades Probit (Monje 2007) para obtener los parámetros utilizados (Tabla 5) para la curva estándar de DBF y posteriormente determinamos la CI₅₀ de DBF en agar R2A.

Tabla 5. Parámetros utilizados para obtener la CI₅₀ de DBF

Concentración de DBF (mg/l)	Log de la concentración de DBF (mg/l)	Porcentaje de mortalidad	Probit del porcentaje de mortalidad
0	0	0	0
200	2.30	22.70	4.25
500	2.70	47.95	4.95
700	2.85	55.72	5.14
1000	3.00	75.38	5.69
1200	3.08	90.07	6.29

Al graficar el log de la concentración de DBF y las unidades Probit del porcentaje de mortalidad (Fig. 6) obtuvimos la ecuación de la recta: $y=1.917x-0.0635$, determinando que la CI_{50} para DBF fue de 473 mg/l.

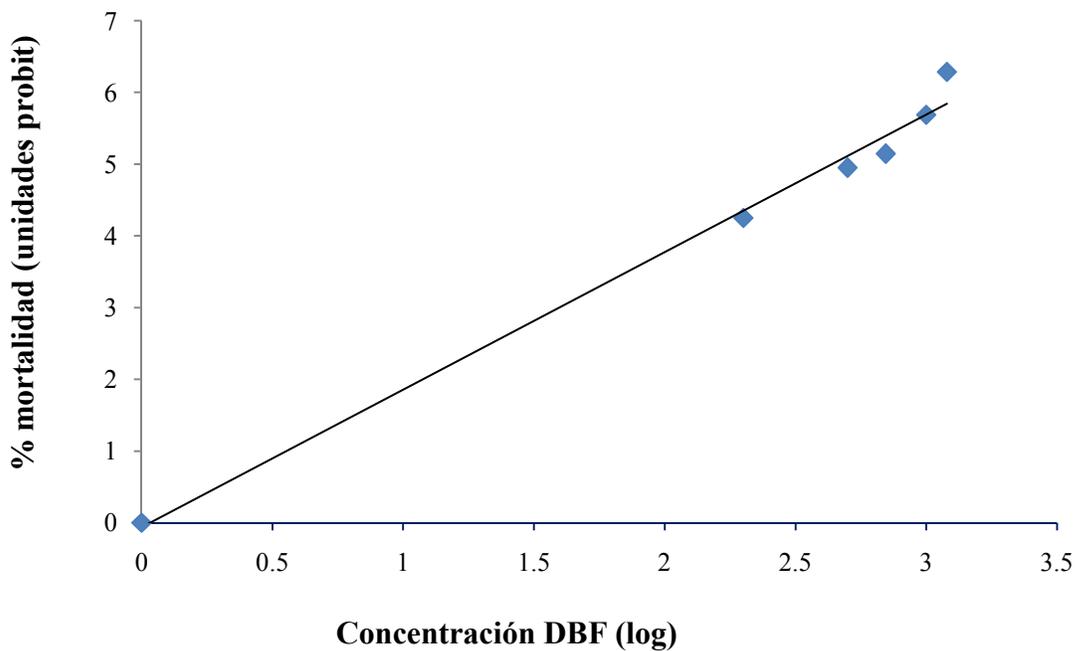


Fig. 6. Porcentaje de mortalidad de colonias de *E. coli* obtenido en diferentes concentraciones de DBF

7.4. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida de *Neurospora* sp mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias en los tres medios cultivo utilizados

Para la cepa de *Neurospora* sp en el medio de 1000 mg/l de DBF se observó que a medida que pasaban los días de fermentación aumentaba el número de colonias de *E. coli*. Es decir, se presentaron mayor número de colonias de bacterias en el día 21 ($1.6E10$) en comparación con el primer día de la fermentación ($1.1E9$). En el medio de 500 mg/l de DBF se observó que al igual que en el medio de 1000 mg/l de DBF a medida que pasaban los días de fermentación aumentaba el número de colonias de *E. coli*. Es decir, se presentaron mayor número de colonias de bacterias en el día 21 ($3.1E10$) en comparación con el primer día de la fermentación ($6.0E8$). En el medio sin adición de ftalato se obtuvieron $3.07E9$ colonias de *E. coli* durante los 21 días de la fermentación, mostrando un crecimiento uniforme durante el tiempo que duró la fermentación líquida (Fig. 7). Se observó que de los tres medios utilizados, en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF se obtuvieron mayor número de colonias de *E. coli* en el último día de la fermentación.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el primer día de la fermentación de los tres medios de cultivo utilizados se observó que no existe una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* entre los medios de cultivo de 1000 y 500 mg/l de DBF respectivamente ($P>0.05$). Por el contrario, para los medios de 1000 mg/l de DBF y sin adición de ftalato se observó una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* ($P=0.0002$). Asimismo, para los medios de 500 mg/l de DBF y sin adición de ftalato también se observó una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* ($P=0.0002$).

Para el punto medio (240 h) de la fermentación se observó una diferencia significativa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P<0.0001$).

Para el punto final de la fermentación (540 h) se observó una diferencia significativa entre los medios que contenían 1000 mg/l de DBF y 500 mg/l de DBF ($P<0.0001$). Asimismo, se observó diferencia significativa entre los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y sin adición de ftalato una diferencia significativa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P<0.0001$).

Por el contrario, no se observó diferencia significativa entre los medios de cultivo de 500 mg/l de DBF y sin adición de ftalato ($P>0.05$).

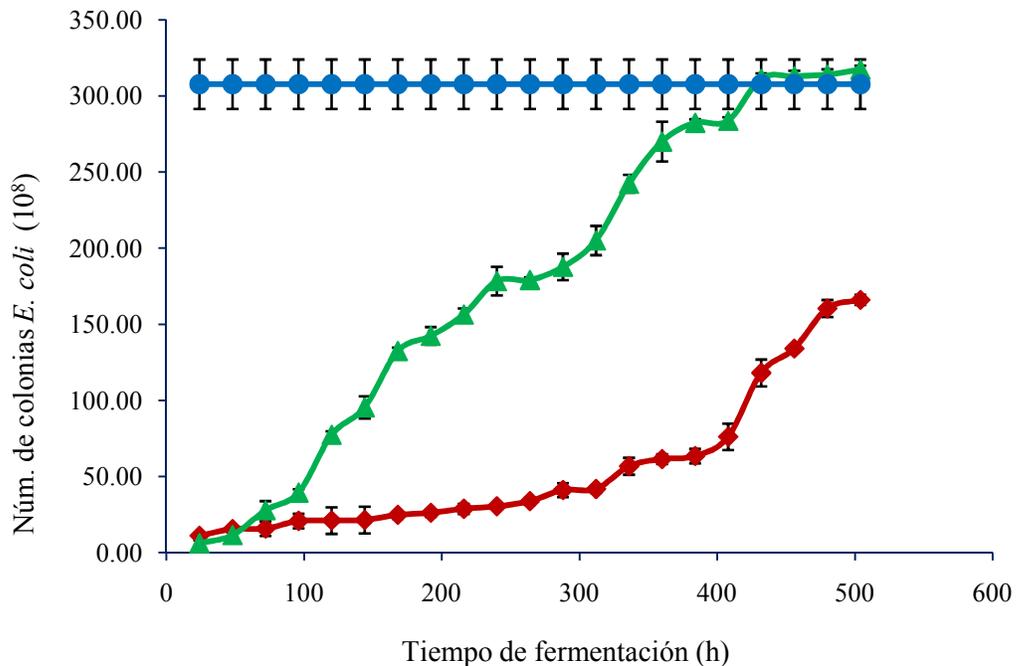


Fig. 7. Número de colonias de *E. coli* obtenidas a lo largo de la fermentación líquida en el sobrenadante de los cultivos de *Neurospora* sp desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

7.5. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida de *Hypocrea lixii* mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias en los tres medios cultivo utilizados

Para la cepa de *Hypocrea lixii* en el medio de 1000 mg/l de DBF se observó que a medida que pasaban los días de fermentación aumentaba el número de colonias de *E. coli*. Es decir, se presentaron mayor número de colonias de bacterias en el día 21 ($3.1E10$) en comparación con el primer día de la fermentación ($2.0E8$). En el medio de 500 mg/l de DBF se observó que al igual que en el medio de 1000 mg/l de DBF a medida que pasaban los días de fermentación aumentaba el número de colonias de *E. coli*. Es decir, se presentaron mayor número de colonias de bacterias en el día 21 ($2.9E10$) en comparación con el primer día de la fermentación ($3.3E7$). En el medio sin adición de ftalato se obtuvieron $3.3E10$ colonias de *E. coli* durante los 21 días de la fermentación, mostrando un crecimiento uniforme durante el tiempo que duró la fermentación líquida (Fig. 8). Se observó que de los tres medios utilizados, en el medio sin adición de ftalato se obtuvieron mayor número de colonias de *E. coli* en el último día de la fermentación.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el primer día de la fermentación de los tres medios de cultivo utilizados se observó que no existe una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* entre los medios de cultivo de 1000 y 500 mg/l de DBF respectivamente ($P>0.05$). Por el contrario, para los medios de 1000 mg/l de DBF y sin adición de ftalato se observó una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* ($P<0.0001$). Asimismo, para los medios de 500 mg/l de DBF y sin adición de ftalato también se observó una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* ($P<0.0001$).

Para el punto medio (240 h) de la fermentación se observó que existe una diferencia significativa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P<0.0001$).

Para el punto final de la fermentación (540 h) se observó una diferencia significativa entre los medios de cultivo conteniendo 500 mg/l de DBF y sin adición de ftalato ($P=0.0223$). Por el contrario, no se observó diferencia significativa entre los medios de cultivo conteniendo 1000 y 500 mg/l de DBF respectivamente ($P>0.05$). Asimismo, no se observó diferencia

significativa entre los medios de cultivo conteniendo 1000 mg/l de DBF y sin adición de ftalato ($P>0.05$).

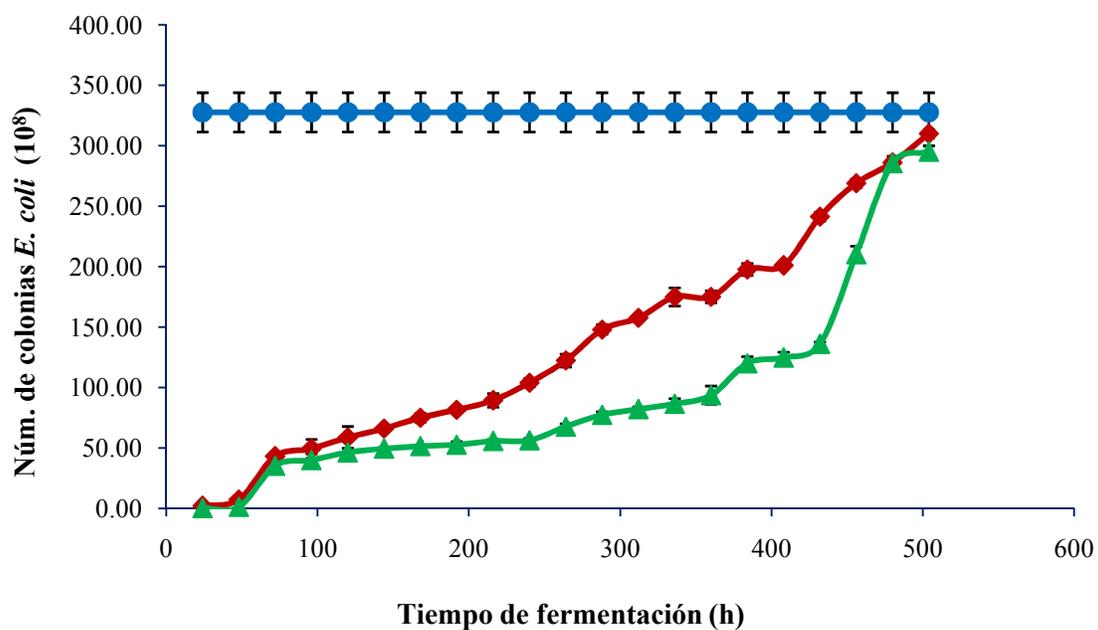


Fig. 8. Número de colonias de *E. coli* obtenidas a lo largo de la fermentación líquida en el sobrenadante de los cultivos de *Hypocrea lixii* desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

7.6. Determinación de la toxicidad del sobrenadante de los cultivos de la fermentación líquida de *Aspergillus niger* mediante la evaluación de la viabilidad de crecimiento de bacterias en los tres medios cultivo utilizados

Para la cepa de *Aspergillus niger* en el medio de 1000 mg/l de DBF se observó que a medida que pasaban los días de fermentación aumentaba el número de colonias de *E. coli*. Es decir, se presentaron mayor número de colonias de bacterias en el día 21 ($3.19E10$) en comparación con el primer día de la fermentación ($6.7E7$). En el medio de 500 mg/l de DBF se observó que al igual que en el medio de 1000 mg/l de DBF a medida que pasaban los días de fermentación aumentaba el número de colonias de *E. coli*. Es decir, se presentaron mayor número de colonias de bacterias en el día 21 ($3.06E10$) en comparación con el primer día de la fermentación ($6.3E7$). En el medio sin adición de ftalato se obtuvieron $3.21E10$ colonias de *E. coli* durante los 21 días de la fermentación, mostrando un crecimiento uniforme durante el tiempo que duró la fermentación líquida (Fig. 9). Se observó que de los tres medios utilizados, en el medio sin adición de ftalato se obtuvieron mayor número de colonias de *E. coli* en el último día de la fermentación.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el primer día de la fermentación de los tres medios de cultivo utilizados se observó que no existe una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* entre los medios de cultivo de 1000 y 500 mg/l de DBF respectivamente ($P>0.05$). Por el contrario, para los medios de 1000 mg/l de DBF y sin adición de ftalato se observó una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* ($P<0.0001$). Asimismo, para los medios de 500 mg/l de DBF y sin adición de ftalato también se observó una diferencia significativa del número de colonias de *E. coli* ($P<0.0001$).

Para el punto medio (240 h) de la fermentación se observó una diferencia significativa entre los tres medios de cultivo utilizados con respecto al número de colonias de *E. coli* ($P<0.0001$).

Para el punto final de la fermentación (540 h) de los tres medios de cultivo utilizados no se observó una diferencia significativa entre los tres medios de cultivo utilizados con respecto al número de colonias de *E. coli* ($P=0.2878$).

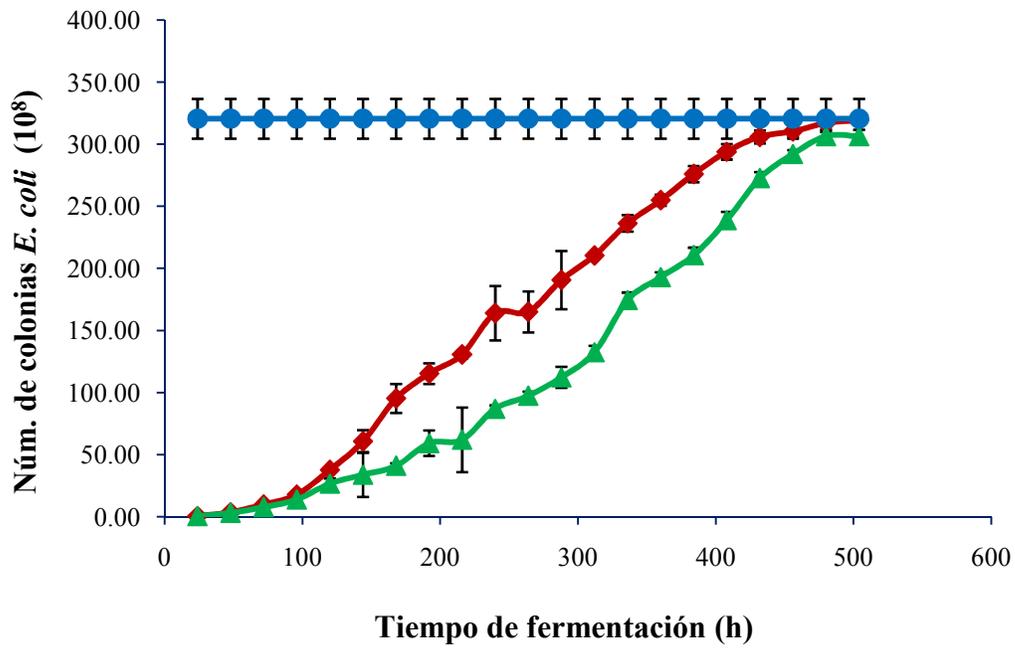


Fig. 9. Número de colonias de *E. coli* obtenidas a lo largo de la fermentación líquida en el sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus niger* desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

7.7. Determinación del grosor de la pared y diámetro de las hifas en medio sólido de la ZJ y ZM de las cepas de *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*

En la tabla 6 y 7 se muestran los datos del grosor de la pared de la hifas de la ZJ y ZM respectivamente de las cepas de *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*.

Se observó que para la cepa de *Neurospora* sp el grosor de la pared de la hifa de la ZJ en el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, en el medio de 500 mg/l de DBF se presentó mayor grosor de la pared de la hifa en comparación con el medio sin adición de ftalato. Con respecto a la ZM observamos que en el medio de 1000 mg/l de DBF también se obtuvo mayor grosor de la pared de la hifa en comparación con los otros dos medios de cultivo. Para el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa comparándolo con el medio sin adición de ftalato.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa de la ZJ en los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0005$). También se observó una diferencia significativa entre el medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0005$). Por el contrario, no se encontró una diferencia significativa entre los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$).

Para el caso de la ZM realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa de la ZM en los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0001$). También se observó una diferencia significativa entre el medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0001$). Por el contrario, no se encontró una diferencia significativa entre los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$).

Para la cepa de *Hypocrea lixii* se observó que el grosor de la pared de la hifa de la ZJ en el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, en el medio de 500 mg/l de DBF se presentó mayor grosor de la pared de la hifa en comparación con el medio sin adición de ftalato. Con respecto a la ZM observamos que en el

medio de 1000 mg/l de DBF también se obtuvo mayor grosor de la pared de la hifa en comparación con los otros dos medios de cultivo. Para el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa comparándolo con el medio sin adición de ftalato.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa de la ZJ en los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0020$). También se observó una diferencia significativa entre el medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.0020$). Por el contrario, no se encontró una diferencia significativa entre los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$).

Para el caso de la ZM realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa de la ZM en los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P<0.0001$). También se observó una diferencia significativa entre el medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P<0.0001$). Por el contrario, no se encontró una diferencia significativa entre los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$).

En el caso de la cepa *Aspergillus niger* se observó que el grosor de la pared de la hifa de la ZJ en el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, en el medio de 500 mg/l de DBF se presentó mayor grosor de la pared de la hifa en comparación con el medio sin adición de ftalato. Con respecto a la ZM se observó que en el medio de 1000 mg/l de DBF también se obtuvo mayor grosor de la pared de la hifa en comparación con los otros dos medios de cultivo. Para el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa comparándolo con el medio sin adición de ftalato. Se comparo la ZJ de los tres medios de cultivo para cada cepa. Asimismo, se comparó la ZM de los tres medios de cultivo para cada cepa. No se hizo una comparación entre la ZJ y la ZM de las tres cepas de hongos.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa ZJ en los tres medios de cultivo utilizados ($P<0.0001$).

Para el caso de la ZM realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que existe una diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa de la ZM en los tres medios de cultivo utilizados ($P=0.0008$).

Tabla 6. Grosor de la pared (μm) de la ZJ de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	0.1138 ^a (0.01)	0.213 ^b (0.008)	0.251 ^b (0.03)
<i>Hypocrea lixii</i>	0.124 ^a (0.02)	0.200 ^b (0.003)	0.221 ^b (0.02)
<i>Aspergillus niger</i>	0.103 ^a (0.007)	0.175 ^b (0.01)	0.222 ^c (0.01)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P<0.05$).

Tabla 7. Grosor de la pared (μm) de la ZM de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	0.128 ^a (0.02)	0.248 ^b (0.01)	0.290 ^b (0.02)
<i>Hypocrea lixii</i>	0.130 ^a (0.003)	0.230 ^b (0.006)	0.239 ^b (0.007)
<i>Aspergillus niger</i>	0.167 ^a (0.02)	0.206 ^b (0.005)	0.251 ^c (0.01)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

En la tabla 8 y 9 se muestran los datos del diámetro de las hifas (μm) de la ZJ y ZM respectivamente de las cepas de *Neurospora sp*, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*.

Se observó que para la cepa de *Neurospora sp* el diámetro de la hifa de la ZJ en el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, en el medio de 500 mg/l de DBF se presentó mayor diámetro de la hifa en comparación con el medio sin adición de ftalato. Con respecto a la ZM se observó que en el medio de 1000 mg/l de DBF también se obtuvo mayor diámetro de la hifa en comparación con los otros dos medios de cultivo. Para el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor diámetro de la hifa comparándolo con el medio sin adición de ftalato.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa de la ZJ entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

Para el caso de la ZM realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que también existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa de la ZM entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

Para la cepa de *Hypocrea lixii* se observó que el diámetro de la hifa de la ZJ en el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, en el medio de 500 mg/l de DBF se presentó mayor diámetro de la hifa en comparación con el medio sin adición de ftalato. Con respecto a la ZM se observó que en el medio de 1000 mg/l de DBF también se obtuvo mayor diámetro de la hifa en comparación con los otros dos medios de cultivo. Para el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor diámetro de la hifa comparándolo con el medio sin adición de ftalato.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa de la ZJ entre los tres medios de cultivo utilizados ($P = 0.0002$).

Para el caso de la ZM realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que también existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa de la ZM entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

En el caso de la cepa *Aspergillus niger* se observó que el diámetro de la hifa de la ZJ en el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo. Asimismo, en el medio de 500 mg/l de DBF se presentó mayor diámetro de la hifa (1.344) en comparación con el medio sin adición de ftalato. Con respecto a la ZM se observó que en el medio de 1000 mg/l de DBF también se obtuvo mayor diámetro de la hifa en comparación con los otros dos comparándolo con el medio sin adición de ftalato (1.164). Se comparó la ZJ de los tres medios de cultivo para cada cepa. Asimismo, se comparó la ZM de los tres medios

de cultivo para cada cepa. No se hizo una comparación entre la ZJ y la ZM de las tres cepas de hongos.

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que sí existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa de la ZJ en los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.006$). También se observó una diferencia significativa entre el medio de 500 mg/l de DBF y el medio sin adición de ftalato ($P=0.006$). Por el contrario, no se encontró una diferencia significativa entre los medios de cultivo de 1000 mg/l de DBF y 500 mg/l de DBF ($P>0.05$).

Para el caso de la ZM realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) se observó que existe una diferencia significativa del diámetro de la hifa de la ZM entre los tres medios de cultivo utilizados ($P<0.0001$).

Tabla 8. Diámetro de las hifas (μm) de la ZJ de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	1.017 ^a (0.03)	1.581 ^b (0.14)	1.969 ^c (0.07)
<i>Hypocrea lixii</i>	1.097 ^a (0.04)	1.497 ^b (0.07)	1.767 ^c (0.10)
<i>Aspergillus niger</i>	1.109 ^a (0.05)	1.344 ^b (0.04)	1.477 ^b (0.07)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P<0.05$)

Tabla 9. Diámetro de las hifas (μm) de la ZM de las tres cepas de hongos filamentosos

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	Sin adición de ftalato	DBF (mg/l)	
		500	1000
<i>Neurospora sp</i>	1.127 ^a (0.02)	1.664 ^b (0.10)	2.210 ^c (0.14)
<i>Hypocrea lixii</i>	1.122 ^a (0.07)	1.593 ^b (0.09)	1.959 ^c (0.05)
<i>Aspergillus niger</i>	1.164 ^a (0.02)	1.395 ^b (0.01)	1.694 ^c (0.09)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

7.8. Determinación del grosor de la pared de la hifa del sobrenadante de la fermentación líquida de las cepas de *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*

Para la cepa de *Neurospora* sp, con respecto al grosor de la pared de la hifa (0.588 μm) se observó que para el medio de 1000 mg/l de DBF fue mayor en comparación con los otros dos medios de cultivo al final de los 21 días de la fermentación. De la misma manera, en el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa (0.531 μm) en comparación con el medio sin adición de ftalato (0.288 μm) (Fig. 10).

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el último día de la fermentación (540 h) se observó que existe diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

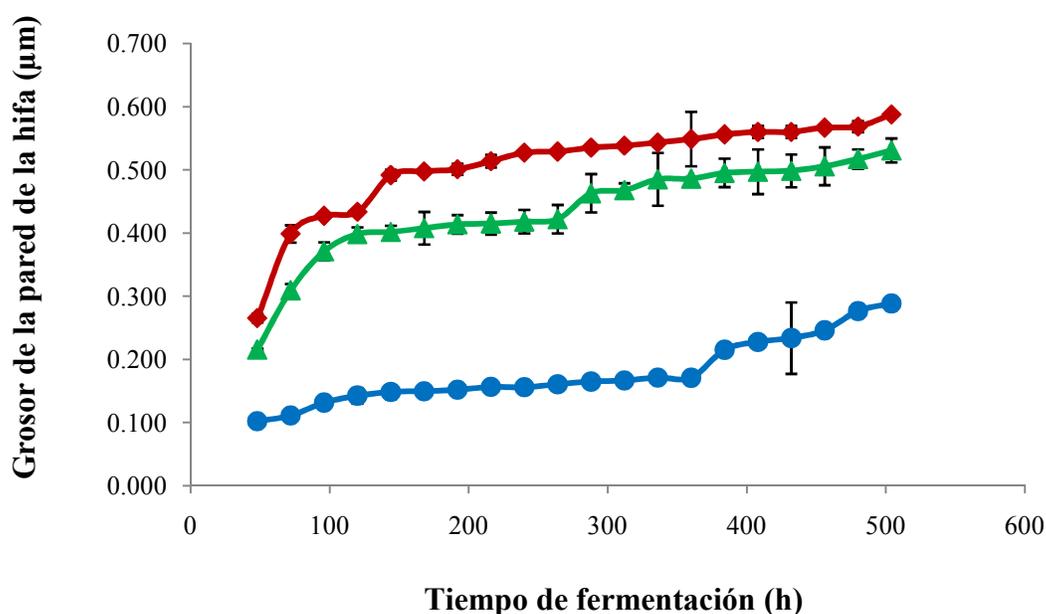


Fig. 10. Grosor de la pared de la hifa de *Neurospora* sp de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

En el caso de la cepa de *Hypocrea lixii* se observó mayor grosor de la pared de la hifa (0.591 μm) para el medio de 1000 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo al final de los 21 días de la fermentación. De la misma manera, en el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa (0.529 μm) en comparación con el medio sin adición de ftalato (0.285 μm) (Fig. 11).

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el último día de la fermentación (540 h) se observó que existe diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

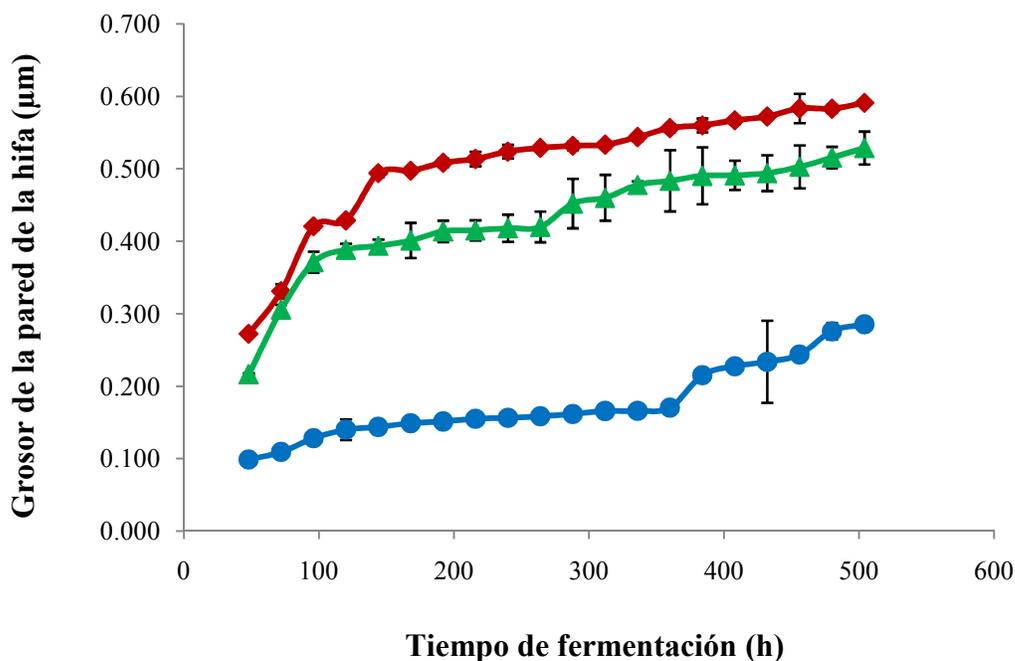


Fig. 11. Grosor de la pared de la hifa de *Hypocrea lixii* de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

Para la cepa de *Aspergillus niger*, con respecto al grosor de la pared de la hifa (0.578 μm) para el medio de 1000 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo al final de

los 21 días de la fermentación. De la misma manera, en el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa (0.521 μm) en comparación con el medio sin adición de ftalato (0.248 μm) (Fig. 12).

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el último día de la fermentación (540 h) se observó que existe diferencia significativa del grosor de la pared de la hifa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

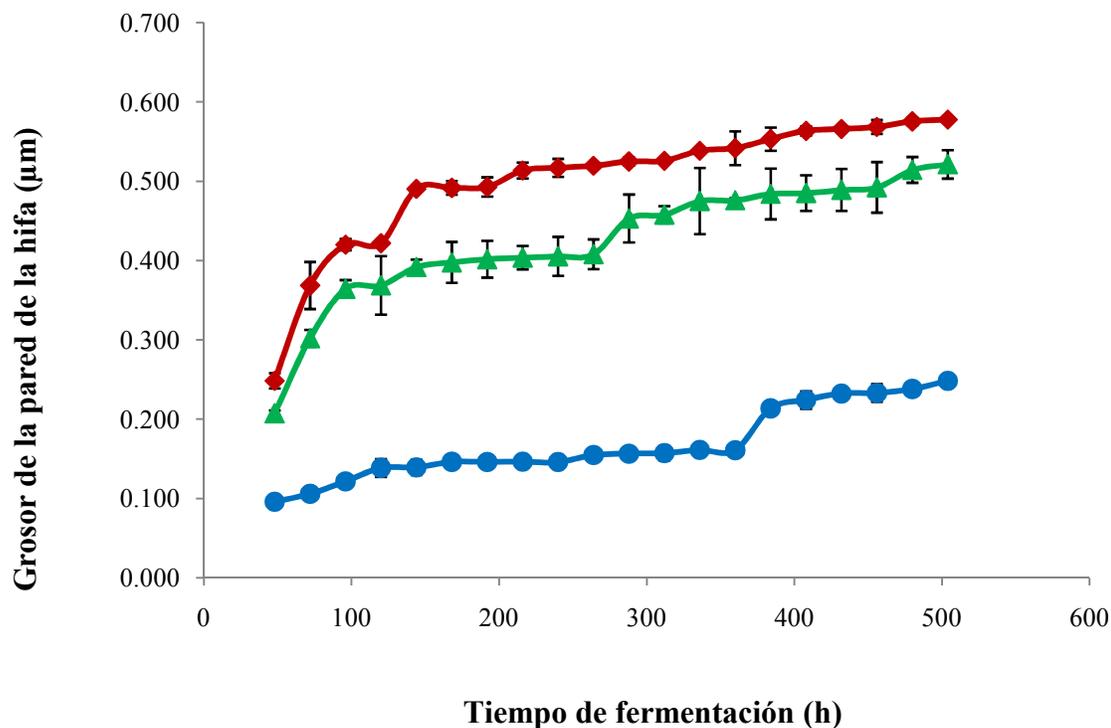


Fig. 12. Grosor de la pared de la hifa de *Aspergillus niger* de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (◆), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

7.9. Determinación del diámetro de la hifa del sobrenadante de la fermentación líquida de las cepas de *Neurospora sp*, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*

En el caso del diámetro de la hifa, para *Neurospora sp* se observó mayor diámetro (3.778 μ m) para el medio de 1000 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo al final de los 21 días de la fermentación. De la misma manera, en el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor diámetro de la hifa (3.260 μ m) en comparación con el medio sin adición de ftalato (2.066 μ m) (Fig. 13).

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el último día de la fermentación (540 h) se observó que existe diferencia significativa del diámetro de la hifa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

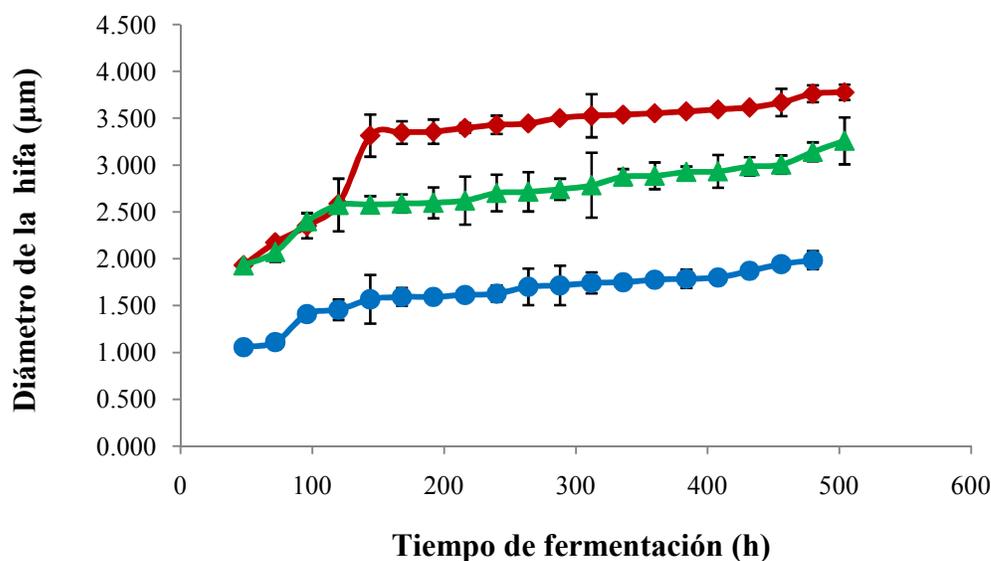


Fig. 13. Diámetro de la hifa de *Neurospora sp* de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (♦), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

En el caso de la cepa de *Hypocrea lixii* se observó mayor diámetro de la hifa (3.8610 μ m) para el medio de 1000 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo al final de los 21 días de la fermentación. De la misma manera, en el medio de 500 mg/l de DBF se

observó mayor diámetro de la hifa (3.273 μm) en comparación con el medio sin adición de ftalato (2.066 μm) (Fig. 14).

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el último día de la fermentación (540 h) se observó que existe diferencia significativa del diámetro de la hifa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

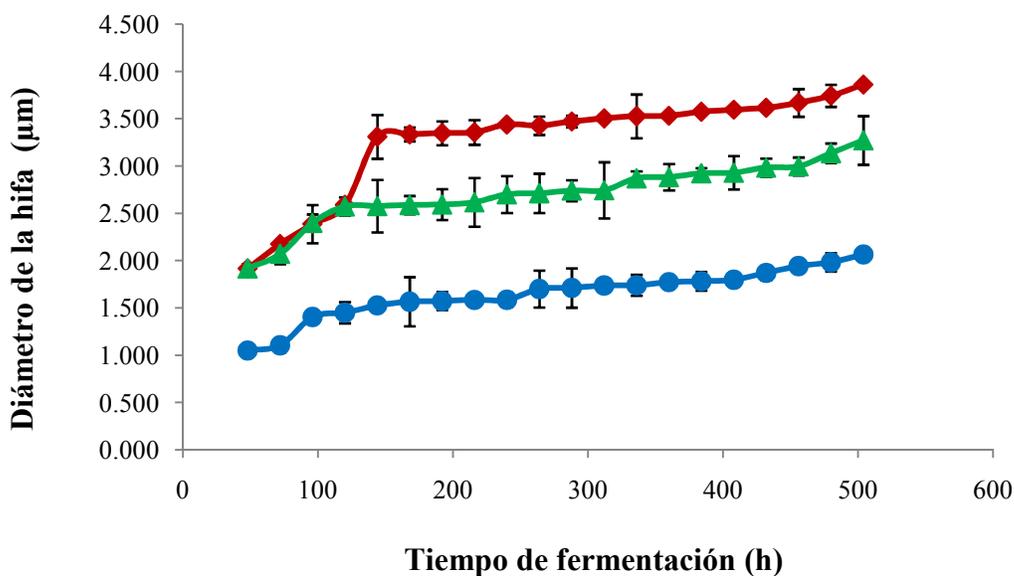


Fig. 14. Diámetro de la hifa de *Hypocrea lixii* de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (♦), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●).

Para la cepa de *Aspergillus niger*, con respecto al diámetro de la hifa (3.757 μm) para el medio de 1000 mg/l de DBF en comparación con los otros dos medios de cultivo al final de los 21 días de la fermentación. De la misma manera, en el medio de 500 mg/l de DBF se observó mayor grosor de la pared de la hifa (3.236 μm) en comparación con el medio sin adición de ftalato (1.822 μm) (Fig. 15).

Realizando el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para el último día de la fermentación (540 h) se observó que existe diferencia significativa del diámetro de la hifa entre los tres medios de cultivo utilizados ($P < 0.0001$).

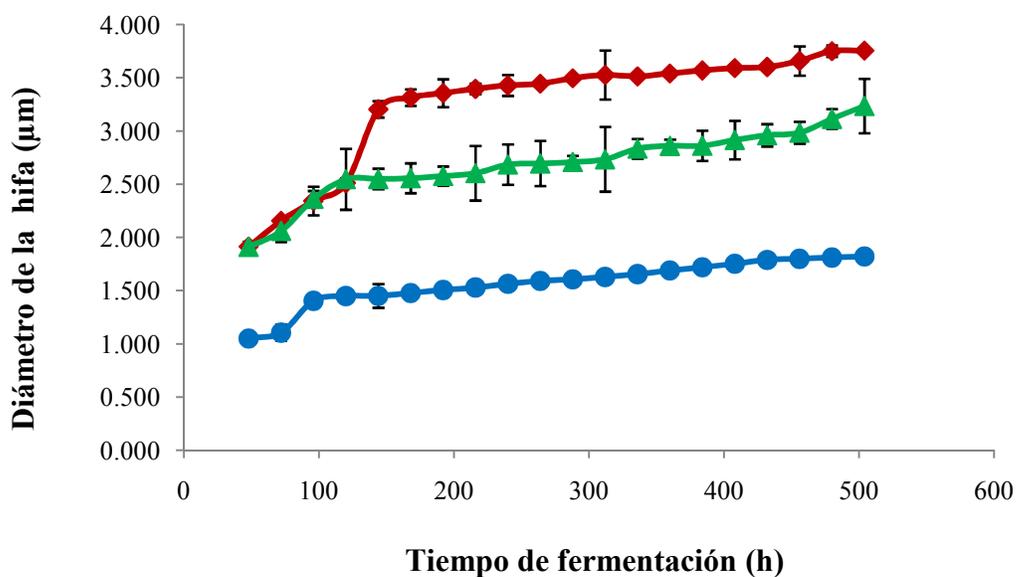


Fig. 15. Diámetro de la hifa de *Aspergillus niger* de la fermentación líquida desarrollado sobre 1000 mg/l de DBF (♦), 500 mg/l de DBF (▲) y sin adición de ftalato (●)

8. DISCUSIÓN

Lee y cols. (2006) observaron el efecto, en el crecimiento micelial del hongo *Polyporus brumalis*, del DBF a tres diferentes concentraciones (250, 750 y 120 μM). Reportaron que en general, el crecimiento micelial disminuyó conforme aumentaba la concentración de DBF. En el medio de 250 μM no reportaron una inhibición significativa del crecimiento micelial. En los medios de 750 y 120 μM observaron una inhibición significativa del crecimiento del hongo. Contrario a esto, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que las tres cepas de hongos aisladas previamente de la industria productora de papel (*Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*) crecieron en los dos medios de cultivo a una concentración de 1800 y 3500 μM de DBF (concentraciones más altas que las utilizadas en el estudio de Lee y cols. 2006). Por lo tanto, se muestra que estas cepas fueron capaces de utilizar el DBF como fuente de carbono y energía. Se ha reportado que la adsorción física de DBF por el micelio ocurre gradualmente conforme se incrementa el tiempo de incubación (Lee y cols. 2006). De esta manera, el hongo *Neurospora* sp, mostró mayor V_r tanto en el medio de 1800 y 3500 DBF μM (500 y 1000 mg/l de DBF respectivamente).

En otro estudio previo (Cuamatzi 2011, tesis de maestría), se midió la V_r de las tres cepas utilizadas en este trabajo de investigación crecidas sobre DEHF. Se observó que la cepa de *Neurospora* sp mostró mayor V_r en DEHF al igual que en DBF. En este mismo estudio, se observó que las tres cepas fueron capaces de crecer en 1000 mg/l y 500 mg/l de DEHF respectivamente. Al igual que los resultados obtenidos en esta tesis, se encontró que en el trabajo de Cuamatzi (2011, tesis de maestría), la cepa de *Hypocrea lixii* obtuvo mayor V_r en el medio mineral en comparación con los medios conteniendo 1000 y 500 mg/l de DBF. Sin embargo, para ambos trabajos no se observó una diferencia estadística significativa, entre los tres medios de cultivo para esta cepa.

Las tres cepas de hongos aisladas previamente de la industria productora de papel (*Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*) invadieron la caja petri en menor tiempo (alrededor de 3 días) que *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Daldinia concéntrica* (hongos de pudrición blanca) (Lee y cols. 2004).

Se observó que *Neurospora* sp y *Aspergillus niger* aumentaban su crecimiento radial conforme aumentaba la concentración de DBF. Para las tres cepas de pudrición blanca se observó que el crecimiento radial disminuyó conforme aumentaba la concentración de DBF (Lee y cols. 2004). La cepa de *Hypocrea lixii* mostró un comportamiento similar al previamente reportado. Lee y cols. (2004) utilizaron 10, 50, 100, 200 y 500 (misma concentración utilizada en esta tesis) mg/l de DBF. Para las cepas de *P. chrysosporium* y *T. versicolor* se inhibió el crecimiento radial a la concentración de 500 mg/l de DBF. Por el contrario, *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger* crecieron en la concentración de 500 y 1000 mg/l de DBF respectivamente. Para estas cepas no se observó inhibición del crecimiento radial. Las tres cepas de hongos crecieron también en el medio sin adición de ftalato lo que podría ser debido a que el hongo es la fuente de carbono presente en el agar que contiene el inóculo. Otra posible razón, es que cuando no existe fuente de carbono para el hongo, sus células se degradan y utilizan los glucanos que se liberan por la lisis de la pared celular de las hifas.

Cuamatzi (2011) evaluó la densidad de biomasa producida al final del avance radial para tres cepas de hongos aisladas de la industria productora de papel (*Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger*). Encontró que las cepas de *Neurospora* sp y *Aspergillus niger* mostraron un incremento de biomasa en presencia de DEHF mostrando elevadas probabilidades de degradación y metabolización de DEHF. Asimismo, la cepa de *Neurospora* sp y *Aspergillus niger* produjeron mayor biomasa en los medios conteniendo 500 y 1000 mg/l de DBF. Estos resultados muestran que consumieron el compuesto como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Por el contrario, la cepa de *Hypocrea lixii* produjo mayor biomasa en el medio sin adición de ftalato en comparación con el DEHF, en el cual esta cepa produjo mayor biomasa en el medio conteniendo 1000 mg/l de DEHF (Cuamatzi 2011).

Patil y cols. (2005) reportaron que la bacteria *Delfia* sp. TBKNP-05 presentó un crecimiento bacteriano máximo en 4 días de incubación en un medio líquido de sales minerales conteniendo 2000 mg/l de DBF. Las condiciones de incubación fueron a 32°C \pm 2°C y en agitación a 180 rpm. Observaron que esta bacteria fue capaz de degradar completamente esta concentración de DBF en 5 días de incubación. En nuestro trabajo, las tres cepas de hongos

utilizadas, mostraron crecimiento en la fermentación líquida en los dos medios de cultivo que contenían DBF 500 y 1000 mg/l de DBF en 21 días (25°C, 200 rpm). Se ha reportado que el tamaño del pellet y la velocidad de agitación son parámetros que influyen en el incremento de la actividad enzimática y velocidad de degradación de ftalatos. A una menor velocidad de agitación (100 rpm) se observa mayor degradación de estos compuestos. Sin embargo, para hongos de pudrición oscura (ascomicetos), se necesita incrementar la velocidad de agitación (150-200 rpm) para lograr mayor degradación de estos compuestos (Kim y Song 2009). Los hongos utilizados en esta tesis no alcanzaron la fase estacionaria por lo que no se reportó la biomasa máxima calculada (se reportó la obtenida experimentalmente). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tiempo de incubación deberá incrementarse para futuros estudios. Por un lado, estos datos muestran que los hongos degradan con menor rapidez a una concentración más baja de DBF en comparación con las bacterias (específicamente *Delfia* sp. TBKNP-05). Por otro, muestran que las tres cepas de hongos previamente aisladas de la industria productora de papel utilizan el plastificante como única fuente de carbono y energía. A diferencia del medio sólido, la cepa de *Hypocrea lixii* mostró mayor μ en el medio de 500 mg/l de DBF en comparación con las otras cepas.

Durante los 21 días de la fermentación, el pH de los tres medios de cultivo disminuyó progresivamente en comparación con el primer día. Esto se debe a que de manera general, la degradación de DBF comienza con la biodegradación primaria de los ésteres de ftalato y monoésteres de ftalato a ácido ftálico (Staples y cols. 1997) produciendo diferentes ácidos grasos como los ácidos hexadecanoicos, octadecanoicos, entre otros (Lee y cols. 2006). Asimismo, Lee y cols. (2004) reportaron que el pH de los medios de cultivo disminuye conforme aumenta el tiempo de incubación (crecimiento).

La CI_{50} obtenida fue de 473 mg/l. Se ha reportado que la CI_{50} de Dietil Ftalato (DEF) para esta bacteria fue de 197.37 mg/l. Esto indica que *E. coli* fue más tolerante a este tipo de compuestos (Gogra y cols. 2010).

En un trabajo previo, se utilizó la bacteria *E. coli* para estudios de degradación y toxicidad de los productos de DEHF. En este trabajo, utilizaron 500 mg/l de DEHF. Observaron que el

ftalato fue degradado alrededor del 90% por la acción de la enzima cutinasa (aislada de un ascomiceto). Encontraron que los productos de degradación utilizando cutinasa no resultaron tóxicos para la bacteria *E. coli* pues no se encontró daño proteico ni estrés oxidativo. En este trabajo reportaron que los hongos filamentosos presentes en el suelo (*Aspergillus* y *Trichoderma*) son productores de cutinasas (Kim y cols. 2006). En este trabajo, se observó que a medida que pasaban los días de fermentación, el número de colonias de la bacteria *E. coli* aumentaba lo que muestra que el sobrenadante del día 21 resulto ser menos inhibitorio en comparación con los otros días de fermentación, ya que los primero días de incubación inhibieron el crecimiento bacteriano. Se observó mayor número de colonias de *E. coli* (en el día 21 de la fermentación) para el medio de 1000 mg/l de DBF en las tres cepas de hongos estudiadas. Por lo anterior, estos resultados demuestran que el hongo degrada el DBF y lo utiliza como fuente de carbono. Además, los productos de degradación no resultaron tóxicos para la bacteria. Asimismo, se sugiere que el primer paso de la degradación de DBF ocurre en el medio a través de una reacción enzimática (Lee y cols. 2006).

Por otro lado, se ha reportado que el contenido de glucanos solubles e insolubles de la ZM son menores en comparación con los de la ZJ. En esta última, se observa una cantidad alta de glicógeno. Las hifas de la ZM son más hidrofóbicas en comparación con las de la ZJ. Estas zonas se relacionan con el almacenamiento de glucanos, el grosor y cambio de las propiedades biofísicas de la pared (Sánchez y cols. 2004). Las cepas de *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger* presentaron mayor grosor de la pared y diámetro de la hifa en el medio que conteniendo 1000 mg/l de DBF tanto de la ZJ como de la ZM en medio sólido.

Las tres cepas de hongos previamente aisladas de la industria productora de papel presentaron mayor grosor de la pared y diámetro de la hifa a lo largo de los 21 días de la fermentación líquida en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF. En segundo lugar, presentaron mayor grosor y diámetro de la hifa en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF. Asimismo, el grosor de la pared y diámetro de las hifas incrementaron progresivamente conforme transcurría el tiempo de incubación. Los resultados del grosor de la pared y diámetro de la hifa de la ZJ y la ZM. Así como, los obtenidos del grosor de la pared y diámetro de la hifa en medio líquido

indican que los hongos incorporan el DBF a las hifas como nutriente para poder realizar sus procesos metabólicos y de crecimiento.

Se ha reportado la degradación de DEF, DMF y DBF empleando *Pleurotus ostreatus*. Este hongo mostró gran capacidad de degradar estos compuestos después de 12 días. Esta cepa de hongo degradó con mayor velocidad el DBF, demostrando que *Pleurotus ostreatus* utilizó el DBF como fuente de carbono y energía (Hwang y cols. 2008). En otro trabajo, se reportó que las cepas de hongos aisladas del suelo y desarrollados sobre DEHF mostraron producción de biomasa después de 20 días de fermentación conteniendo 5000 mg/l de DEHF como única fuente de carbono y energía (Sánchez y cols. 2009).

Por lo tanto, los experimentos realizados en estas tesis nos muestran que los hongos *Neurospora* sp, *Hypocrea lixii* y *Aspergillus niger* utilizan el DBF como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Asimismo, demuestran que degradan el DBF a compuestos menos tóxicos, ya que el sobrenadante de la fermentación líquida de los hongos no resultó tóxico para la bacteria utilizada (*E. coli*).

Para finalizar, consideramos que se deben realizar otros estudios para corroborar que el DBF está siendo degradado a compuestos menos tóxicos por un método de cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas. Asimismo, se puede corroborar la velocidad de degradación de este compuesto por un método de HPLC.

9. CONCLUSIONES

- Las tres cepas de hongos utilizadas fueron capaces de crecer en los medios que contenían DBF.
- La cepa de *Neurospora* sp presentó mayor V_r comparación con las otras dos cepas en el medio conteniendo 500 mg/l de DBF. A diferencia de lo anterior, la cepa de *Aspergillus niger* produjo mayor biomasa en comparación con las otras dos cepas en el medio de cultivo conteniendo 500 mg/l de DBF. La cepa de *Hypocrea lixii* mostró mayor velocidad específica de crecimiento en comparación con las otras dos cepas en el medio de 500 mg/l de DBF. En el caso de la fermentación líquida, de la cual obtuvimos la μ , el pH de los cultivos de las tres cepas fue disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de fermentación.
- Con respecto al estudio de toxicidad, podemos concluir que el sobrenadante de la fermentación líquida no resultó tóxica para la *E. coli*, ya que conforme aumentaba el tiempo de fermentación también aumentaba el número de colonias de la bacteria, obteniendo una CI_{50} de 473 mg/l de DBF.
- Para las tres cepas de hongos, el grosor de la pared y el diámetro de la hifa en medio sólido de la ZJ y la ZM fue mayor en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF. Asimismo, el grosor de la pared y el diámetro de las hifas medidos durante la fermentación líquida fueron mayores en el medio conteniendo 1000 mg/l de DBF.
- En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que las tres cepas de hongos estudiadas, utilizan el DBF como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Asimismo, demuestran que degradan el DBF a compuestos menos tóxicos, ya que el sobrenadante de la fermentación líquida de los hongos no resultó tóxico para la bacteria utilizada (*E. coli*).

10. PERSPECTIVAS

- Análisis enzimático para determinar la presencia de cutinasas en los tres hongos estudiados.
- Cuantificar la degradación de DBF después del crecimiento del hongo empleando técnicas cromatográficas.
- Determinar los productos de degradación de DBF después del crecimiento del hongo empleando cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.

11. REFERENCIAS

- Bustamante MP, Lizama SB y Olaíz FG. 2001. Ftalatos y efectos en la salud. REV INT CONTAM AMBIE 17:205-215.
- CERHR. 2006. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, NTP-CERHR-DEHP-05. Available at <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/dehp/DEHP-Monograph>.
- Chang BV, Wang TH y Yuan SY. 2004. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. CHEMOSPHERE. 69:1116-1123.
- Chaverri P y Samuels GJ. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. MOL PHYLOGENET EVOL. 27:302-313.
- Chaverri P, Samuels GJ y Stewart EL. 2001. *Hypocrea virens* sp. nov. the teleomorph of *Trichoderma virens*. MYCOLOGY. 97:1113-1124.
- Cheng Y y Prusoff W. 1973. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC50) of an enzymatic reaction. BIOCHEM PHARMACOL 22(23):3099-108
- Conrad S, Sung G, Giráldez F, Townsend J, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny B, Kauff F, Wang Z, Gueidan C, Andrie R, Trippe K, Ciuffetti L, Wynns A, Fraker E, Hodkinson B, Bonito G, Groenewald J, Arzanlou M, Hoog S, Crous P, Hewitt D, Pfister D, Peterson K, Gryzenhout M, Wingfield M, Aptroot A, Suh S-O, Blackwell M, Hillis D, Griffith GW, Castlebury L, Rossman A, Lumbsch H, Uecker R, B ¨udel B, Rauhut A, Diederich P, Ertz D, Geiser D, Hosaka K, Inderbitzin P, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Mostert L, O'donnell K, Sipman H, Rogers J, Shoemaker R, Sugiyama J, Summerbell R, Untereiner W, Johnston P, Stenroos S, Zuccaro A, Dyer P, Crittenden P, Cole M, Hansen K, Trappe JM, Yahr R, Lutzon F, and Spatafora JW. 2009. The Ascomycota Tree of life: A Phylum-wide Phylogeny

Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. SYST BIOL. 58(2):224-239.

Criado A y Muñiz M. 1978. Nuevas transformaciones en experimentos biológicos basados en la respuesta cuantitativa. BOL SER PLAGAS 4:89-229

Cuamatzi M. 2011. Identificación y evaluación del crecimiento sobre Di (2 etilhexil) ftalato de cepas de hongos aisladas del proceso de reciclado de una industria productora de papel. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Dodd SL, Lieckfeldt E, Chaverri P, Overton BE y Samuels GJ. 2002. Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs. MYCOL PROG 1:409-428

Europea de Sustancias Químicas (ECB).2003. Summary risk assessment report (RAR 003) on dibutyl phthalate (DBP). GreenFacts.

European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI).2001.Eco-profile of high volume commodity phthalate esters (DEHP/DINP/DIDP). ECOBILAN. Price Waterhouse Coopers. La Défense, France.

Furtmann K.1994. Phthalates in surface water – a method for routine trace level analysis. FRES J ANAL CHEM 348:291-296.

Gogra A, Yao J, Sandy E, Zheng S, Zaray G, Koroma B y Hui Z. 2010. Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger* and the biodegradation of Diethyl Phthalate (DEF) via Microcalorimetry. AM J SCI 6:78-88.

Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I y Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. NAT REV MICROBIOL 2:43-56.

- Hashizume K, Nanya J, Toda Ch, Yasui T, Nagano H y Kojima N. 2002. Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. BIOL PHARM BULL 25:209-214.
- Hernández L. 2003. Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. innocua*. Tesis de licenciatura en ingeniería de alimentos. Universidad de las Américas-Puebla.
- Herrera T y Uloa M. 1998. El reino de los hongos. En: Micología básica y aplicada. Editorial Fondo de Cultura Económica. México DF. P 552
- Hoetelmans R. 2011. PK-PD relationships for antiretroviral drugs. FDA. Amsterdam, The Netherlands.
- Huber W, Grasl-Kraupp B y Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. CRC CR REV TOXICOL 26:365-481.
- Hwang S, Soon-Seok K, Hyoung T y Hong-Gyu S. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. J MICROBIOL BIOTECH 18(4):767-772.
- Infante S y Calderón L. 1994. Manual de análisis Probit. Centro de estadística y Cómputo Aplicado. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco, México. P108.
- Ingraham J e Ingraham C. 1995. Introducción a la Microbiología. Editorial Reverte. Barcelona.
- Kendrick B. 1985. The fifth kingdom. Mycologi. Waterloo, Ontario.
- Kim Y y Song H. 2009. Effect offungal pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation. J MICROBIOL 47:420-424.

- Kim YH, Seo H, Min J, Kim Y, Ban Y, Han K, Park J, Bae K, Gu M y Lee J. 2006. Enhanced degradation and toxicity reduction of dehexyl phthalate by *Fusarium oxisporum* f. *pisi* cutinase. J APPL MICROBIOL 102:221-228.
- Kim YH, Lee J, Ahn JY, Gu, MB y Moon SH. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, *Fusarium oxisporum* f. *pisi* cutinase. ENVIRON MICROBIOL 68:4684-4688.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute. Kew, Surrey.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Borner T y Kubicek C.P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. PNAS 93:7755-7760.
- Lee S, Koo B, Lee S, Kim M, Choi D, Hong E, Jeung E y Choi I. 2004. Biodegradation of dibutyl phthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. ENZYME MICROB TECH 35:417-423
- Lee S, Lee J, Koo B, Kim M, Choi D y Choi I. 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus *Polyporus brumalis*. BIOTECHNOL BIOENG 97:1516-1522.
- Liang D, Zhang T, Herbert H y He J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. APPL MICROBIOL BIOT 80: 183-198.
- Madigan M, Martinko J y Parker M. 2005. Brock. Biología de los microorganismos. Editorial Pearson Educación. Madrid.
- Méndez RC, Vergaray G, Béjar RV y Cardenas JK. 2007. Isolated and characterization of polyethylene-biodegrading mycomycetes. REV PERU BIOL 13:203-205.
- Mendoza A. 2008. Capítulo 5. Listado adicional al convenio de Estocolmo: sustancias de uso industrial. Ftalatos. Instituto Nacional de Ecología.

- Monje B. 2007. Determinación de la dosis letal media (DL50) de cinco especies del género *Micrurus* en estado de cautiverio en Nilo-Cundinamarca (Colombia). Tesis de licenciatura en biología con énfasis en biorecursos. Universidad de la Amazonia
- Moore D. 1998. Fungal morphogenesis. Editorial Cambridge University Press. Reino Unido.
- Nataro P y Kaper J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. CLIN MICROBIOL REV 11(1):142-201
- Olea N, Fernández MF y Martín P. 2001. Disruptores endócrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. REV SALUD AMBIENT 1(2):64-72.
- Papavizas GC. 1985. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. ANNU REV PHYTOPATHOL 23:23-54.
- Patil N, Kundapur R, Shouche Y y Karegoudar T. (2005). Degradation of a Plasticizer, di-n-Butylphthalate by *Delfia* sp. TBKNP-05. CURR MICROBIOL 52:225-230.
- Patrauchan M, Florizone C, Dosanjh M, Mohn W, Davies J, Eltis L. (2005). Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. J BACTERIOL 187:4050-4063.
- Reeslev M y Kjøller A.1995. Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. ENVIRON MICROBIOL 61:4236–4239.
- Sánchez C, Ryder RA, Vilki Z y Robson G. 2009. Enrichment and identification of di (2-ethylhexyl) phthalate-degrading fungi from soil. APPL MICROBIOL BIOT (in press).
- Sanchez C, Téllez-Téllez M, Díaz-Godínez G y Moore D. 2004. Simple staining detects ultrastructural and biochemical differentiation of vegetative Hyphae and fruit body initials in colonies of *Pleurotus pulmonarius*. LETT APPL MICROBIOL 38:483-487.

- Schem B. 2007. Biodiversity of the genus *Trichoderma* and identification of marker genes involved in the antagonism between *Trichoderma* sp and plant pathogenic fungi. Tesis de doctorato di ricerca in biotecnologie microbiche. Universita' Degli Studi Di Sassari.
- Schwarze F, Engels J y Mattheck. 2000. Fungal Strategies of Wood Decay in Tress. Springer Verlag, Berlín.
- Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF y Adams WJ. 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 35:667-749.
- Tanaka T, Yamada K, Tonosaki T, Konishi T, Goto H y Taniguchi M. 2000. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. *WATER SCI TECHNOL* 42:89-95.
- Téllez M. 2002. Determinación de las propiedades bioquímicas de hifas jóvenes y maduras de la fase vegetativa de *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Veracruzana.
- Villena G y Gutiérrez-Correa M. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *REV PERU BIOL* 10(1):78-87.
- Wang Y y Gu J. 2006. Degradability of dimethyl terephthalate by *Variovorax paradoxus* T4 and *Sphingomonas yanoikuyae* D0S01 isolated from deep-ocean sediments. *ECOTOXICOLOGY* 6:549-557.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Teylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR-protocol and application-A laboratory Manual (N. Innis D. Gelfand J. Sninsky and T. White, Eds.). Academic Press, New York. 315-322.
- Xia F, Zheng PZQ y Feng X. 2004. Relationship between quantitative structure and biodegradability of phthalic acid ester compounds. *AGRIC LIFE SCI* 30:141-146.

Xiaoran S y Zhongjian S. 2007. Removal of Di-*n*-butyl Phthalate Using Immobilized Microbial Cells. CHINESE J CHEM ENG 15(2):167-171.

12. PUBLICACIONES



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

Constancia

A: Miriam Ahuactzin Pérez

Por la presentación de su ponencia

"Crecimiento de diferentes cepas de hongos filamentosos sobre di (2-Etilhexil) ftalato y dibutil ftalato aisladas del proceso de reciclado de una industria productora de papel "

VI CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
INTERNATIONAL CONGRESS XVII NATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

VIII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

Acapulco, Gro./ México
Del 24 al 26 de Marzo del 2010


IBQ. Raúl Chávez Alvircio
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.


IBQ. R. Alejandro Romo Mexía Gutiérrez
Presidente del Congreso


Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas
Presidente Honorario



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

Constancia

a:

Miriam Ahuactzin Pérez

Por su asistencia al:

VI CONGRESO INTERNACIONAL INTERNATIONAL CONGRESS XVII CONGRESO NACIONAL NATIONAL CONGRESS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

VIII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

Acapulco, Gro./ México
Del 24 al 26 de Marzo del 2010

IBQ. Raúl Chávez Alvirca
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.

IBQ. R. Alejandro Romo Mejía Gutiérrez
Presidente del Congreso

Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas
Presidente Honorario



EL COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

CONSTANCIA

A:

MIRIAM AHUACTZIN PÉREZ

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE

CRECIMIENTO DE DIFERENTES CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS SOBRE BI(2-FILHEDS) FTALATO Y DIBUTIL FTALATO AISLADAS DEL PROCESO DE RECLAJEO DE UNA INDUSTRIA PRODUCTORA DE PAPEL

(Miriam Ahuactzin Pérez, Nuria Montiel Alvarado, Gerardo Díaz Guillón, Bárbara Elisa Guillón, Carmen Sánchez)

VI CONGRESO INTERNACIONAL INTERNATIONAL CONGRESS

XVII

XVII CONGRESO NACIONAL NATIONAL CONGRESS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

VIII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

Acapulco, Gro./ México
Del 24 al 26 de Marzo del 2010

IBQ. Raúl Chávez Alvirca
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.

IBQ. R. Alejandro Romo Mejía Gutiérrez
Presidente del Congreso

Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas
Presidente Honorario



LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA
Y BIOINGENIERÍA, A.C. DELEGACIÓN YUCATÁN

Otorga el presente

Reconocimiento



Por la presentación del trabajo

CRECIMIENTO DE DIFERENTES CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS SOBRE
FTALATOS AISLADAS DEL PROCESO DE RECICLADO DE UNA INDUSTRIA
PRODUCTORA DE PAPEL. *Martín Cuamatzi-Muñoz, Miriam Ahuactzin-Pérez, Nerit
Montiel-Marlín, Gerardo Díaz-Godínez, Rubén Díaz y Carmen Sánchez.

V Congreso Regional de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste

del 27 al 29 de octubre de 2010

Mérida Yucatán, a 29 de octubre de 2010.

PRÉSIDENTE SMBB Yucatán
Dr. Víctor M. Toledo López

SECRETARIO SMBB Nacional
Dr. Octavio Leera Corral



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.



Otorgan la presente

Constancia

A la C. Miriam Ahuactzin Pérez.

Por su importante participación con el CARTEL: "Evaluación del Crecimiento sobre
Dibutil Ftalato y Biomasa de Hongos Filamentosos Aislados del Proceso de Reciclado
de Papel"; en el marco del II Seminario de Investigación de Cuerpos Académicos de la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, evento académico celebrado el día 04 de
marzo de 2011 en las instalaciones del Auditorio anexo a Rectoría.

"Por la Cultura a la Justicia Social"
Tlaxcala, Tlax., Marzo 04 de 2011.

Mtro. Rubén Reyes Córdoba.
Coordinador



DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD
COORDINACIÓN





El Instituto Tecnológico de Morelia y el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología

organizan la presente

CONSTANCIA

Miriam Ahuactzin Pérez

Por su asistencia a las actividades académicas realizadas en el marco del
**1er. Congreso Nacional de Investigación en Ciencias
y Tecnología en Ingeniería Bioquímica**

Morelia, Michoacán, 13 de Mayo de 2011.


MC. José Diego Bercenas Torres
Jefe del Departamento
de Ingeniería Bioquímica




Dr. Elijé Rafael Romero García
Presidente de la Academia
de Ingeniería Bioquímica



El Instituto Tecnológico de Morelia y el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología

organizan el presente

RECONOCIMIENTO

Miriam Ahuactzin Pérez, José Luis Torres García, Adriana Madrid-Ramírez, Rodrigo Arcelega Matehual, Gerardo Díaz Godínez, Jorge Soriano Santos, Blanca Rosa Rodríguez-Pastrana y Carmen Sánchez

Por su participación con la ponencia: EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL Y RENDIMIENTO DE TRES CEPAS DE HONGOS ASÓMICETOS CRECIDOS SOBRE UN PLASTIFICANTE (DIBUTIL FTALATO), realizada en el marco del

1^{er} Congreso Multidisciplinario
de las Ingenierías

Morelia, Michoacán, Mayo de 2011.


Ignacia López-Pedraza
Directora General del Instituto Tecnológico
de Morelia


Pedro Alito Vázquez
Director General del Consejo
Estatal de Ciencia y Tecnología



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERECTORÍA DE INVESTIGACION

Confirma el presente

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN A:

*Abascio-Pérez M., Torres-García J.L., Madrid-Rosales A., Archibugi-Maldonado R.,
Díaz-González G., Soriano-Soto L., Rodríguez-Pastrana R.R., Sánchez C.*

Con el Trabajo Libre en calidad de Ponente:

*"EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO SOBRE SUBSTRATO FTALATO Y BROMASA OBTENIDA DE UNGUÓN
FILAMENTOSOS AISLADOS DEL PROCESO DE RECLADO UNA INDUSTRIA PRODUCTORA DE PAPEL."*

En el
II CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA HUMANA
VI CONGRESO NACIONAL DE BIOLOGÍA
II CONGRESO COSTARRICENSE DE BIOTECNOLOGÍA

organizado por la Red Latinoamericana de Genética Humana (2011-2012) y la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica en conjunto con el Colegio de
Biólogos de Costa Rica, Sede San José, el 13 de mayo al 16 de mayo de 2011, en San José de Costa Rica

Realizado en el Hotel "El Greenhouse" Biología, San José, Costa Rica del mes de mayo del 2011



La Universidad Autónoma de Guadalajara
a través de la
Facultad de Ciencias
otorga el presente

Reconocimiento

A:

MIRIAM AHUACTZIN PÉREZ

Por su participación como asistente
al 3er. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía
"Aportes de la Química a las Ciencias Biológicas y Agronómicas".
Zapopan, Jalisco, México., 28 de septiembre al 1° de octubre del 2011.

Ing. José Antonio Baraja de la Torre
Director de la Unidad Académica de Ciencias, Químicas y Tecnología

Ing. Tonala Orosco Salas
Directora de la Facultad de Ciencias

Trasciende
con VALORES





La Universidad Autónoma de Guadalajara
a través de la
Facultad de Ciencias
otorga el presente

Reconocimiento

al: **Ahuactzin Pérez M, Torres García JL, Madrid Ramírez A, Arciniega
Matlalcuatzi R, Díaz Godínez G, Soriano Santo J, Rodríguez Pastrana BI y
Sánchez C**

autor(es) del trabajo científico:
"Crecimiento de diferentes cepas de hongos filamentosos del género ascomiceto sobre di (2-etilhexil
ftalato y dibutil ftalato aisladas del proceso de reciclado de una industria productora de papel"

Presentado en el marco del 3er. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía
"Aportes de la Química a las Ciencias Biológicas y Agronómicas".
Zapopan, Jalisco, México., 28 de septiembre al 1° de octubre del 2011.

Ing. José Antonio Barja de la Torre
Decano de la Unidad Académica de Diseño, Ciencia y Tecnología

Ing. Tomás Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias

Trasciende
con VALORES

