



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**ESTUDIO DE COLONIAS DE *PLEUROTUS OSTREATUS*
DESARROLLADAS EN PRESENCIA DE DI (2-ETILHEXIL) FTALATO
POR GEOMETRÍA FRACTAL**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Nerit Montiel Martínez

Co-directores de Tesis

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz

Tutores

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

Dr. Gerardo Díaz Godínez



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 **Nerit Montiel Martínez** 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 "**Estudio de colonias *Pleurotus ostreatus* desarrolladas en presencia de di (2-etil hexil ftalato) por geometría fractal**".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 10 DE 2012


DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ


DRA. BRENDA HILDELIZA CAMACHO DÍAZ


DR. GUSTAVO FIDEL GUTIÉRREZ LÓPEZ


DRA. MARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ


DRA. MÓNICA ROSALES PÉREZ


DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ



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

Al Posgrado del CTBC, UAT que me brindó la oportunidad de realizarme profesionalmente y de la cual estoy muy agradecida.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al ENCB-IPN por el material proporcionado para la realización esta tesis.

A la Dra Carmen Sánchez, por su dirección en la realización de esta tesis, por sus valiosos consejos que me impulsaron para continuar con mis estudios.

A la Dra Brenda Camacho, por el apoyo brindado y de manera incondicional para la realización esta tesis. Gracias por le hospedaje!.

Al Dr Gustavo, por los comentarios y el apoyo para la realización de esta tesis.

A mis tutores a la Dra. Maura Téllez, al Dr. Gerardo, quienes, me apoyaron de manera continúa.

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que siempre me brindaron su apoyo.

A mis padres, por su apoyo, su amor y comprensión que permanentemente que me hacen sentir.

A mis hermanos, cuñada y sobrino que hacen ver la vida con gran alegría.

A mi nena “Denisse” que siempre me motiva con su sonrisa y me hace sentir la mujer más orgullosa del mundo.

A mis amigos. Ellos saben quiénes son. Por su apoyo incondicional, sus conejos y esos gratos momentos.

A las personas que me apoyaron en la realización de esta tesis.

A las personas que me faltan por mencionar, pero que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis.

A todos.....

GRACIAS!!!

RESUMEN

El di (2tilhexil) ftalato es un compuesto xenobiótico utilizado para dar flexibilidad y suavidad a diferentes productos plásticos. Sin embargo, el amplio uso y producción ha caudado un problema ambiental, siendo tóxico para el humano. *Pleurotus ostreatus* es uno de los principales hongos de pudrición blanca que se caracteriza por tener enzimas ligninolíticas, capaces de degradar compuestos tóxicos de estructura similar a la lignina, como los ftalatos. Varios estudios mencionan que los microorganismos filamentosos que son capaces de desarrollarse sobre sustratos tóxicos, presentan colonias con bordes filamentosos irregulares; esta irregularidad ha sido medida mediante herramientas como la dimensión fractal. Sin embargo, hasta el momento los estudios sobre el desarrollo de *P. ostreatus* sobre medio sólido con ftalatos solo se han basado en la evaluación de la velocidad de crecimiento radial y el incremento de biomasa. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer la relación morfológica de las colonias de *P. ostreatus* utilizando herramientas como la dimensión fractal. Para lo cual se evaluó el desarrollo de *P. ostreatus*, en medios de cultivo sólido conteniendo dos diferentes concentraciones de DEHF (500 y 1000 mg/L) como única fuente de carbono y energía, mediante la relación entre la velocidad de crecimiento radial, la biomasa con respecto a la dimensión fractal del borde las colonias, por el análisis bioquímico de proteasas, glucanasas, quitinasas, lacasas, glicógeno y glucano favorecida en cada medio de cultivo.

De manera general, para *P. ostreatus* crecido en medio nutritivo (conteniendo glucosa), se obtuvieron valores mayores de V_r (0.204 mm/h) y biomasa (0.079 mg), con valores de D_f estables (1.27), además de un alto contenido de glucanos y actividad enzimática en proteasas. Por el contrario, en el medio de cultivo limitado (conteniendo SM), los valores de V_r y biomasa disminuyeron (0.089 mm/h y 0.02 mg, respectivamente) de manera importante, mostrándose en relación a todos los medios de cultivo un incremento en la D_f (1.2). Sin embargo, en cuanto a los medios de cultivo con ftalatos en una concentración de 500 mg/L de DEHF se observó un comportamiento aparentemente similar al del medio de cultivo nutritivo (SM+Gluc), tanto para la V_r (0.178 mm/h), la biomasa (0.019), la D_f (1.15) y la actividad enzimática (lacasas y glucanasas), concluyendo bajo estos parámetros que muy probablemente *P. ostreatus* empleó al ftalato como fuente de carbono de carbono y energía para su desarrollo sobre medio sólido.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los ftalatos.....	1
1.1.1. El di (2-etilhexil) ftalato	2
1.1.2. Exposición al DEHF.....	4
1.1.3. Toxicidad del DEHF	4
1.2. Degradación de ftalatos por biorremediación	6
1.3. Fermentación en medio sólido	7
1.4. <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
1.5. Morfología de <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
1.6. Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
1.7. Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos.....	11
1.8. Morfología de colonias fúngicas.....	13
1.9. Composición de la pared celular de las hifas.....	14
1.9.1. Quitina.....	14
1.9.2. Glucanos.....	14
1.10. Glicógeno en hongos	15
1.11. Enzimas.....	15
1.11.1. Lacasas	15
1.11.2. Quitinasas	16
1.11.3. Proteasas.....	16
1.11.4. Glucanasas.....	17
1.11. Procesamiento de imágenes	17
1.12. Fractales en la naturaleza	19
1.13. Dimensión fractal.....	21
1.14. Método de Conteo de Caja o <i>Box-Counting</i>	23
2. ANTECEDENTES	25

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
4. JUSTIFICACIÓN.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo General.....	30
5.2. Objetivos Particulares	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Medios y condiciones de cultivo	31
6.2. Análisis de dimensión fractal de la periferia de <i>P. ostreatus</i> por el método de conteo de caja.	32
6.2.1. Preprocesamiento de imágenes.....	32
6.3. Evaluación de la velocidad de crecimiento radial de las colonias de <i>P. ostreatus</i>	35
6.4. Evaluación de biomasa de las colonias de <i>P. ostreatus</i>	35
6.5. Análisis enzimático de las colonias de <i>P. ostreatus</i>	36
6.5.1. Determinación del contenido de glicógeno intracelular	36
6.5.2. Determinación del contenido de glucanos de la pared celular.....	37
6.5.3. Determinación de proteasas intracelulares	37
6.5.4. Determinación de lacasas intracelulares	37
6.5.5. Determinación de glucanasas intracelulares	38
6.5.6. Determinación de quitinasas intracelulares	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
7.1. Análisis de dimensión fractal del borde de las colonias de <i>P. ostreatus</i>	39
7.2. Evaluación de velocidad de crecimiento radial de <i>P. ostreatus</i>	40
7.3. Biomasa de <i>P. ostreatus</i> obtenida en los diferentes medios de cultivo	41
7.4. Determinación de actividad enzimática en colonias de <i>P. ostreatus</i>	42
7.5. Relación de la velocidad radial con respecto a la biomasa en colonias de <i>P. ostreatus</i>	45

7.6. Relación de dimensión fractal con respecto a la velocidad de crecimiento radial en colonias de <i>P. ostreatus</i>	46
8. CONCLUSIONES	48
9. REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura química del di (2-etilhexil) ftalato	3
Fig. 2. Estructura del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> (Watson y Dallwitz 2008).....	8
Fig. 3. Cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
Fig. 4. Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	11
Fig. 5. Gráfico de Richardson	22
Fig. 6. Método de "box-counting" cubrimientos a diferentes escalas	24
Fig. 7. Regresión Log N Vs. Log N(s). La pendiente de esta línea es la Df.	24
Fig. 10. Captura de imágenes de colonias de <i>P. ostreatus</i> a través de un escáner acoplado a una PC	32
Fig. 11. Transformación de una imagen a color (a) a escala de grises (b)	33
Fig. 12. Imagen de una colonia de <i>P. ostreatus</i> binarizada.....	33
Fig. 13. Selección de borde en una colonia de <i>P. ostreatus</i>	33
Fig. 14. Borde segmentado de una colonia de <i>P. ostreatus</i>	34
Fig. 15. Procedimiento con fractal box counter a través del programa Image J 1.43u	34
Fig. 16. Determinación de la Df en una colonia de <i>P. ostreatus</i>	34
Fig. 8. Proceso de evaluación de la Vr en una colonia de <i>P. ostreatus</i>	35
Fig. 9. Proceso de evaluación de la biomasa en una colonia de <i>P. ostreatus</i> desarrollada sobre diferentes medios de cultivo.....	36
Fig. 19. Dimensión fractal de <i>P. ostreatus</i> obtenida sobre diferentes medios de cultivo.....	40
Fig. 17. Velocidad de crecimiento radial de <i>P. ostreatus</i> sobre diferentes medios de cultivo	41
Fig. 18. Biomasa de <i>P. ostreatus</i> obtenida sobre diferentes medios de cultivo	42
Fig. 20. Relación de la Vr con la biomasa obtenida en colonias de <i>P. ostreatus</i>	46
Fig. 21. Relación de la dimensión fractal con la Vr en colonias de <i>P. ostreatus</i> sobre diferentes medio de cultivo	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los ftalatos de acuerdo a la magnitud de su uso.....	2
Tabla 2. Métodos para el análisis fractal de colonias fúngicas	21
Tabla 3. Actividad enzimática en colonias de <i>P. ostreatus</i> obtenida sobre diferentes medios de cultivo.....	44

LISTA DE NOMENCLATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
Cd	Cadmio
Co	Cobalto
CO ₂	Bióxido de carbono
Cu	Cobre
DBF	Dibutil ftalato
DEHF	Di (2-etilhexil) ftalato
Df	Dimensión fractal
DF _M	Dimensión fractal de masa
DF _S	Dimensión fractal de superficie
D _A	Dimensión fractal de área
DNS	Ácido dinitro-salícilico
ECE	Extracto crudo enzimático
FES	Fermentación en estado sólido
Hg	Mercurio
K	Potasio
KOH	Hidróxido de potasio
mM	Milimolar
MEHF	Mono etil-hexil ftalato
N	Normal
N	Nitrógeno
NAG	N-acetil glucosamina
nm	Nanómetros
P	Fosforo
Pb	Plomo
pH	Potencial de hidrogeno
PM	Peso molecular
PPAR α	Proliferador de peroxisomas-alfa
PVC	Cloruro de polivinilo
RGB	Colores primarios (rojo “Red”, verde “Green” y azul “Blue”)

rpm	Revoluciones por minuto
R-glucano	Glucano insoluble en álcali
S-glucano	Glucano soluble en álcali
SVC	Sistema de visión por computadora
SM	Medio con sales minerales
SM+Gluc	Sales minerales más glucosa
SM+500 mg/L DEHF	Sales minerales más DEHF a una concentración de 500 mg/L
SM+1000 mg/L DEHF	Sales minerales más DEHF a una concentración de 1000 mg/L
V _r	Velocidad de crecimiento radial
Zn	Zinc
μl	Microlitro

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los ftalatos

Los ftalatos son diésteres aromáticos derivados del ácido orto-ftálico o del ácido tereftálico, que son ampliamente utilizados como plastificantes. Presentan dos cadenas laterales, generalmente alifáticas ramificadas, cicloalifáticos o aromáticos (Fig. 1). Estos compuestos fueron utilizados por primera vez en la década de los 20s, no obstante, su venta a gran escala se dio hasta 1950 con la aparición de la industria del cloruro de polivinilo (PVC por sus siglas en inglés) (KemI, 2000). La liberación de estos compuestos ha causado un problema ambiental, al estar presentes en el aire (Wensing y col., 2005), suelo, sedimentos, rellenos sanitarios (Schwarzbauer y col., 2002; Zheng y col., 2007) y agua, esto como resultado de la producción y el amplio uso de estas sustancias (Liang y col., 2008). Sus metabolitos han resultado ser potencialmente nocivos para el humano, por ser hepatotóxicos, teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos (National Toxicology Program 2006; Matsumoto y col., 2008).

Los ftalatos son sintetizados en cantidades masivas para la producción de diversos plastificantes (Liang y col., 2008). Estos plastificantes se adicionan a diferentes polímeros, principalmente al PVC, para aumentar su flexibilidad y suavidad (Blount y col., 2000). De esta forma existen numerosos productos que contienen ftalatos incluyendo; recubrimientos de pisos, papel tapiz, alfombras, impermeabilizantes, pinturas, adhesivos, pegamentos, aislantes de cables, mangueras, papel, juguetes, cosméticos, empaques para alimentos y materiales médicos desechables (Rudel y Perovich 2008; Koch y col., 2003), por mencionar algunos.

De acuerdo al uso, los ftalatos se han clasificado en diferentes grupos (Tabla 1). Entre ellos, el di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es el más usado, ya que su producción es alrededor de cerca de 18 millones de toneladas cada año a nivel mundial (Koch y col., 2003). Además, es el compuesto más ampliamente utilizado en Europa y USA, por ser el más económico y por la fácil adaptabilidad al producto final, seguido por el DINF y DIDF y posteriormente por los ftalatos especiales que tienen un mercado más restringido (ECPI, 2001).

Tabla 1. Clasificación de los ftalatos de acuerdo a la magnitud de su uso

GOMPUESTO	COMPUESTO
DEHF	Di- 2-etilhexil ftalato
DINF y DIDF	Di-isononil ftalato Di-isodecil ftalato
Ftalatos especiales	di-butil ftalato (DBF) Di-isobutil ftalato (DIBF) Di-isoheptil ftalato (DIHF) Di-isoocetil ftalato (DIOF) Di-isoundecil ftalato (DIUF) Di-isotridecil ftalato (DTCF) Bencilbutil ftalato (BBF) Entre otros.

Estudios han demostrado que los ftalatos de cadenas cortas como el dimetil ftalato, dibutil ftalato, difenil ftalato, dipropil ftalato y butilbenzil ftalato pueden ser fácilmente biodegradados y mineralizados. En cuanto a los ftalatos de cadenas larga tal como, el dicitclohexil ftalato, dioctil ftalato y DEHF tienen baja susceptibilidad de ser biodegradados (Liang y col., 2004).

1.1.1. El di (2-etilhexil) ftalato

El di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es un ftalato que también se denomina 1,2-Ácido benzenodicarboxílico, Ester bis(2-etilhexil), 1,2-Benzenodicarboxilato bis(2-etilhexil), Ftalato bis(2-etilhexil), Dioctil ftalato, Ácido ftalico, Ester bis(2-etilhexil).

El DEHF ($C_{24}H_{38}O_4$) es un éster del ácido ftálico de elevado PM (390,6 g/mol) que se produce mediante la reacción del 2-etilhexanol con el anhídrido ftálico en presencia de un catalizador metálico o ácido, a elevadas temperaturas (CMA, 1999; NTP, 2000).

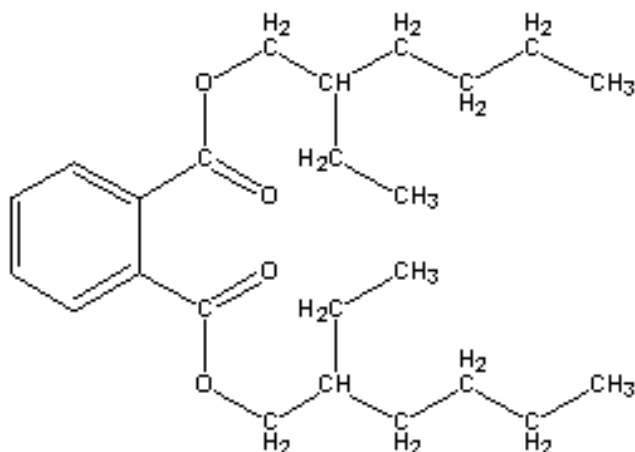


Fig. 1. Estructura química del di (2-etilhexil) ftalato

A temperatura ambiente el DEHF es un líquido aceitoso (densidad =1.08 g/ml) y de color ligeramente amarillo. Su solubilidad en agua es baja, pero es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Es miscible con los aceites minerales y con las grasas (ECPI, 2001).

El DEHF posee una elevada tendencia a separarse de la matriz plástica debido a que no se une químicamente al PVC y dado, a su elevada lipofilia, puede liberarse del plástico de forma relativamente sencilla y rápida cuando se pone en contacto con soluciones acuosas ácidas o lipídicas, o por acción del calor (Xu y col., 2010). Es por ello, que el uso indiscriminado del DEHF en la industria del plástico ha provocado su gran dispersión en el medio ambiente, de modo tal que se encuentra en suelo, en agua, en aire y en los alimentos, razón por la cuál se ha considerado un contaminante ambiental ubicuo (Martinell, 2006; Ji-Joung., 2006; Liu y Lin, 2002; Okubo y col., 2003).

La alta producción de plastificantes, su ubicuidad, su elevada liposolubilidad, su facilidad para liberarse del PVC y su estabilidad en el medio ambiente favorecen su presencia en numerosos entornos (agua, tierra y aire) (Lorz y col., 2002). Por ello, el riesgo de

exposición de los organismos vivos a estos compuestos es elevado (Herreros-Guerra, 2009). Durante los últimos años, los ftalatos de ocurrencia más común, incluyendo el DEHF, fueron clasificados como contaminantes y compuestos interruptores endocrinos conocidos por su efecto potencial sobre la salud humana al interferir con las hormonas endógenas del cuerpo (Sung y col., 2003; European Food Safety Authority 2005; Frommeyer col., 2007; NTP-CERHR 2006; Wormuth y col., 2006).

1.1.2. Exposición al DEHF

La población en general está expuesta al DEHF por ingestión o inhalación, dado que el mismo puede ser vehiculizado a través de los alimentos, del agua y del aire. (NTP, 2000; Stringer y col., 2000). Se considera que la ruta de exposición al DEHF cuantitativamente más importante para la población es a través de los alimentos, razón por la cual se ha llegado a considerar a este plastificante como un “contaminante alimentario” (NTP, 2000).

Con el objetivo de limitar la exposición poblacional al DEHF a través de los alimentos, la “Food and Drug Administration” (FDA-USA) ha establecido un límite para el contenido de DEHF en los materiales que pueden estar en contacto directo con los alimentos, fijando un máximo de 3% (p/p) (Code of Federal Regulations, 1999). Debido a la considerable incorporación del DEHF al organismo a través de los alimentos; distintos países han establecido valores límites preventivos para la población. En Estados Unidos de América, la *Environmental Protection Agency* fijó una dosis diaria de referencia de 20 µg/kg de peso corporal/día mientras que la “Unión Europea” estableció una ingesta diaria tolerable de 37 µg/kg peso corporal/día (Koch y col., 2003).

1.1.3. Toxicidad del DEHF

Cuando el DEHF entra en el organismo del ser humano, se metaboliza en varias sustancias que se eliminan fácilmente. Se ha identificado a uno de sus metabolitos más importantes, el mono etil-hexil ftalato (MEHF), como responsable de la toxicidad del DEHF. Las enzimas que rompen este aditivo químico en su metabolito MEHF se han encontrado

fundamentalmente en el intestino, aunque también están presentes en el hígado, riñones, pulmones, páncreas y en el plasma de algunos organismos. El hecho de que la metabolización del DEHF ocurra en el tracto intestinal implica que la exposición vía ingestión podría ser más peligrosa que la intravenosa. El DEHF produce un amplio espectro de efectos tóxicos en animales de experimentación (incluidos roedores y primates) que van a afectar a diversos órganos y sistemas, como al hígado, sistema reproductor (testículos, ovarios, órganos sexuales secundarios), riñones, pulmones y corazón (Liu y Lin, 2002; Lovekamp-Swan y Davis, 2003, Okubo y col., 2003).

El ftalato DEHF pertenece a una familia de sustancias químicas llamada “proliferadores del peroxisoma”. Los peroxisomas son orgánulos de las membranas celulares que contienen enzimas responsables de la oxidación de los ácidos grasos, la síntesis del colesterol y otras rutas bioquímicas. Se piensa que la proliferación de los peroxisomas está asociada con el cáncer de hígado en animales, dicha proliferación ocurre en menor medida en los humanos que en los roedores y por esta razón algunos investigadores han cuestionado la importancia de la extrapolación de los estudios del DEHF en animales para el caso del hombre (Selevan y col., 2003; Wu y col., 2003; Denham y col., 2005; Cooper y col., 2005; Windham y col., 2005; Chao y col., 2007; Cohn y col., 2007)

El mecanismo toxicológico, tanto del DEHF como del MEHF y otros metabolitos activos, se basa en la inducción de la proliferación de peroxisomas, uniéndose al PPAR α (proliferador de peroxisomas-alfa), molécula que actúa mediando los efectos de distintas sustancias de origen endógeno y exógeno. Al unirse al PPAR α , los ftalatos modifican la expresión de algunos genes, lo que desencadena una modificación en el metabolismo interno celular que se traduce en alteraciones de la producción y liberación hormonal por parte de las células secretoras. Todo ello produce modificaciones en el sistema endocrino y provoca finalmente efectos tóxicos en distintos órganos (Herrerros-Guerra, 2009; Ehrmann y col., 2002, Tabak y col., 2006).

1.2. Degradación de ftalatos por biorremediación

El término biorremediación es una tecnología de control de contaminación que utiliza sistemas biológicos para catalizar la degradación o transformación de compuestos tóxicos a formas menos dañinas. Dichos procesos biológicos se llevan a cabo por distintos organismos, como algas, hongos, plantas, y bacterias, que son utilizados para degradar contaminantes ambientales o bien, por la aplicación de un tratamiento biológico para eliminar las sustancias químicas tóxicas (Maier y col., 2000; Shimao, 2001).

En procesos de biorremediación, en la mayoría de los estudios se enfocan en la habilidad de los hongos de pudrición blanca, para la degradación de compuestos persistentes, principalmente los basidiomicetos donde se encuentra el hongo *Pleurotus ostreatus* (Frazar, 2000). Estos hongos son efectivos porque producen la enzima lacasa, la cual cataliza la reacción en la degradación de la lignina, un compuesto aromático. Para catalizar estas reacciones la enzima requiere peróxido de hidrogeno, lo cual el hongo produce (Seigle-Murandi, 2004; Soo-Min y col., 2006; Scott y Akhtar 2001).

Por otra parte, los hongos tienen ventajas que facilitan su estudio en la biorremediación; por ejemplo, los hongos están presentes en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres, además poseen ventaja sobre las bacterias por el hecho de que sus hifas pueden penetrar el suelo contaminado y producir enzimas que degradan los contaminantes. Se ha demostrado que los hongos de pudrición blanca tienen la capacidad de atacar un amplio espectro de ftalatos (Christian y col., 2005; Soon-Seok y col., 2008; Wong, 2008).

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies. Los hongos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas. Sin embargo, algunos sistemas de producción como la fermentación sumergida no consideran estos importantes aspectos de su fisiología (Villena y Gutiérrez, 2003; Hölker y col., 2004).

1.3. Fermentación en medio sólido

Entre los productos biotecnológicos, las enzimas abarcan el mayor mercado, con precios de venta muy altos. La producción de enzimas a nivel mundial, se basa principalmente en la fermentación microbiana sumergida, durante el proceso, los altos costos se basan en la explotación de microorganismo genéticamente modificados, las condiciones del medio de cultivo, así como, la transformación de productos secundarios. La fermentación microbiana en estado sólido (FES) tiene un enorme potencial para la producción de enzimas, desde el punto de vista económico y ambiental (Ellaiah y col., 2002; Viniegra-González y col., 2003; Hölker y col., 2004; Jech, 2000; Pandey y col., 2000; Soccol y col., 2003; Bhatnagar y col., 2010; Murthy y Naidu, 2010).

La FES, es un proceso llevado a cabo por microorganismos los cuales tiene la capacidad de utilizar como fuente de nutrientes una matriz solida o semisólida caracterizada por la ausencia total o casi total de liquido libre o agua, siendo esencial para la actividad microbiana. El agua está presente en forma absorbida o en complejos con la matriz sólida y el sustrato. Estas condiciones son adecuadas para el crecimiento de hongos, la producción de enzimas y metabolitos, ya que, las condiciones son semejantes a la de sus hábitats naturales (Chutmanop y col., 2008; Kanmani y col., 2009).

La producción de enzimas a partir de hongos filamentosos ha sido desarrollada a través del uso de la fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Sin embargo, la fermentación en medio sólido es una alternativa más adecuada para la producción de enzimas dadas las características fisiológicas y morfológicas de los hongos filamentosos (García y Torres, 2003). La FES ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida para la obtención de productos de alto valor agregado (Castillo y col., 2000), como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios entre otros (Hölker y col., 2004).

1.4. *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr) Kumm. (Dikarya, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricales (Moncalvo y col., 2002). En México, los hongos del genero *Pleurotus* son conocidos llamados setas, pero también son conocidos como: oreja blanca, orejas de palo, orejas de patancán, orejas de cazahuate y orejas de izote (Gaitan, 2002) (Fig. 2).

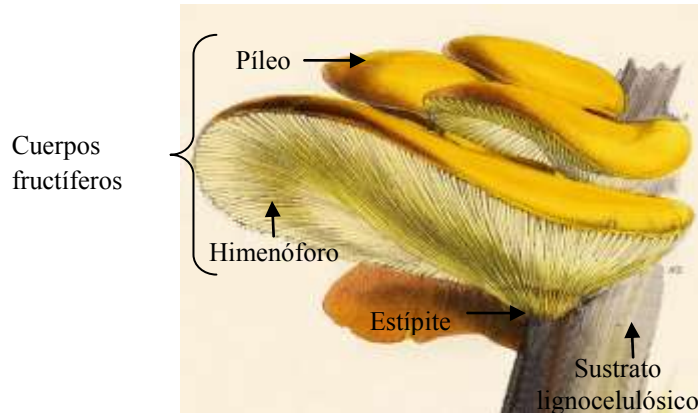


Fig. 2. Estructura del hongo *Pleurotus ostreatus* (Watson y Dallwitz 2008)

P. ostreatus es un hongo que deriva del aspecto de la madera atacada por estos hongos, los cuales se alimentan de lignina dejando la madera en un tono blanquecino (Sánchez, 2009); por ello, el nombre de hongos ligninolíticos, ya que son capaces de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina (un biopolímero aromático) (Robles-Hernández y col., 2008).

El cultivo de *Pleurotus* sp es importante en la industria de alimentos alrededor del mundo la cual se ha expandido en los años pasados. Nutricionalmente es rico en proteínas, fibra, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, además de tener un sabor y olor únicos (Cohen y col., 2002). En el área de la medicina se ha encontrado que *Pleurotus* lleva a cabo actividades antibacteriales, antivirales, antitumores, hematológicas y ayuda en la reducción de los niveles de colesterol. Dado el hecho, que este género ha demostrado tener tantas capacidades en diferentes áreas, sobretodo en el área de biorremediación (Vacchina y col., 2002), es que el hongo *Pleurotus ostreatus* fue escogido para la realización de este estudio.

1.5. Morfología de *Pleurotus ostreatus*

El hongo tiene una apariencia de masa algodonosa, generalmente blanca que técnicamente se llama micelio y que crece sobre el sustrato elegido para su desarrollo. Cabe mencionar, que el micelio es el que se cultiva sobre medios sintéticos en cajas Petri para obtener una cepa (Fig. 3). Ésta crece en forma radial y por ello se forman masas discoidales sobre la superficie en donde crecen. Sin embargo, las colonias tienden a incrementar su tamaño para aprovechar los recursos más cercanos hasta que se hayan agotado. Esta estrategia de nutrición es limitada particularmente para colonias crecidas en medio sólido, mismas que no son capaces de crecer en regiones con bajas concentraciones de nutrimentos (Fernández y Henao, 2007; Bezzi y Ciliberto, 2004; López y Jensen, 2005).

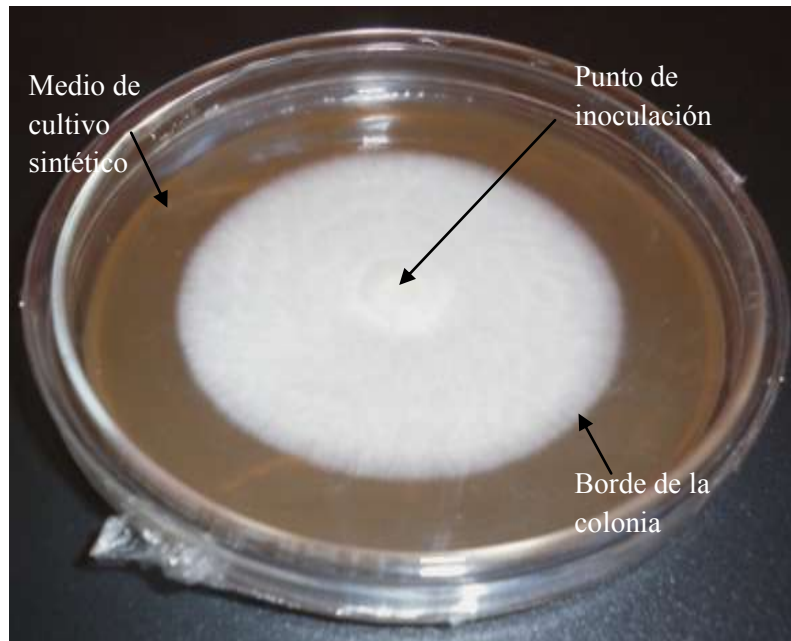


Fig. 3. Cepa de *Pleurotus ostreatus*

1.6. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*

El ciclo de vida de *Pleurotus*, implica una sucesión de etapas que van desde la germinación de las esporas hasta la formación de cuerpos fructíferos. En condiciones adecuadas las esporas germinan y dan lugar al micelio (Moore-Landecker, 1996; Herrera y Ulloa, 1998; Valencia-del Toro, 2002).

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo: los que pertenecen a este grupo son auto compatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo: Son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este modelo. En este las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (A) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (B), formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de hifas (C), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente (E) (el número de cromosomas está representado con la letra n) (Olivier-Laborde, 1991) (Fig. 4).

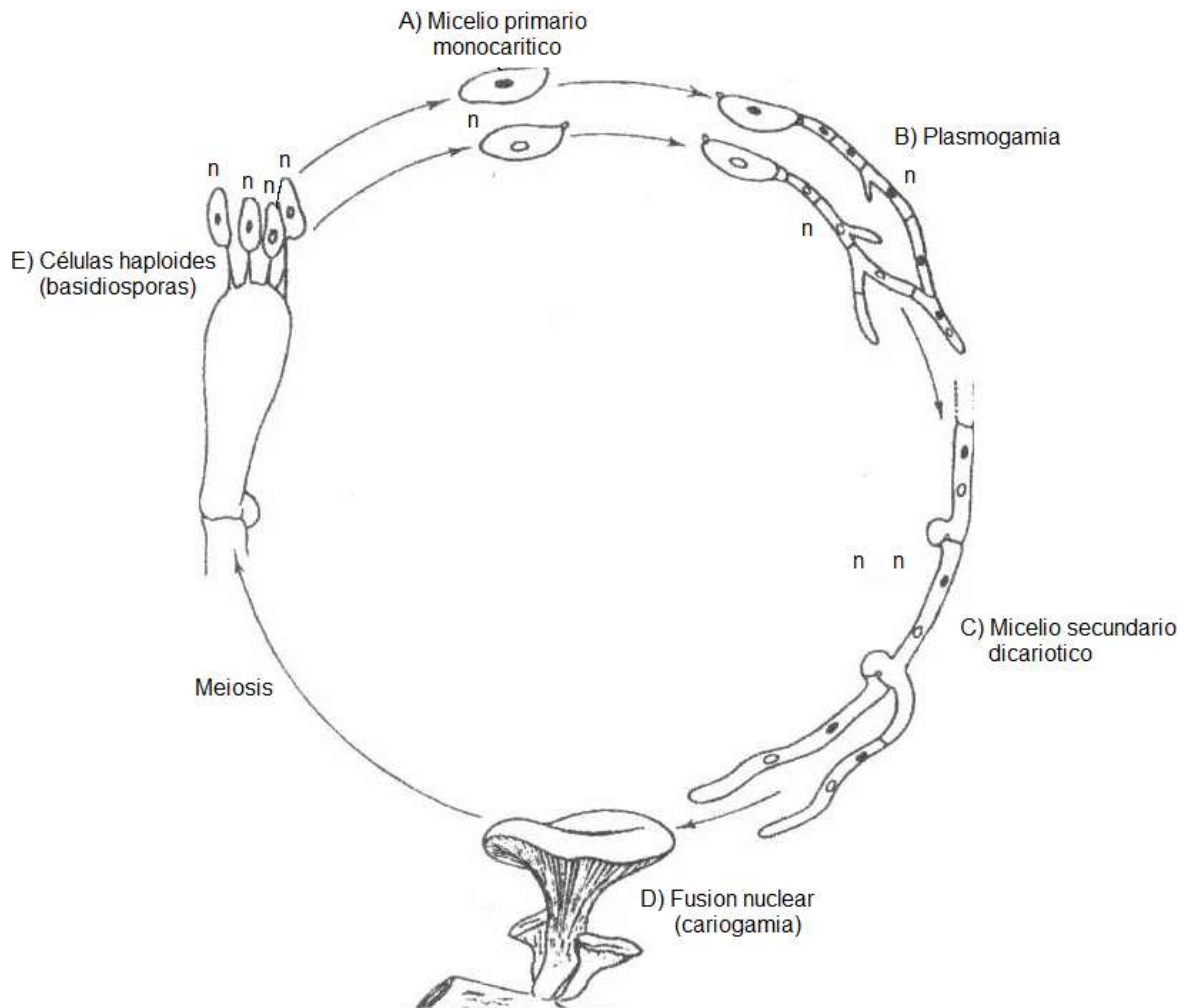


Fig. 4. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*

1.7. Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere un uso potencial en biorremediación (Christian y col., 2005).

Estos hongos ligninolíticos, por ser activos degradadores de lignina, pueden degradar parcial o totalmente compuestos orgánicos persistentes de estructura análoga a la lignina. Por ello, la gran importancia en aplicaciones industriales y en procesos de biorremediación de contaminantes recalcitrantes como plaguicidas, tintes, explosivos aromáticos (Sheremata y Hawari, 2000; Axtell y col., 2000), hidrocarburos policíclicos aromáticos, (Reddy, 1995; Asgher y col., 2008; Pickard y col., 1999, Levin y col., 2003; Zheng y Obbard, 2001); PCBs (Dierich y col., 1995; Fernández-Sánchez y col., 2001) así como, nonifenoles, bisfenoles A y ftalatos (Hwang y col., 2008). La biodegradación de estos compuestos se considera un proceso no específico, oxidativo, llevado a cabo por un sistema enzimático extracelular donde los compuestos son mineralizados a CO₂ (García y Torres, 2003).

Además, la poca especificidad de las enzimas de estos organismos les permite degradar mezclas complejas de estos contaminantes. Las enzimas que presentan este tipo de hongos, son la lignina-peroxidasa, manganeso-dependiente peroxidasa y lacasas, que están relacionadas a la biodegradación de estos compuestos, dado que la purificación de estas enzimas muestra la oxidación de compuestos tóxicos (Suzuki y col., 2003; Tamagawa y col., 2006). Por ello, los hongos de pudrición blanca tienen ventajas en la biodegradación de compuestos tóxicos, por la habilidad de mineralización, oxidación de sustratos insolubles y secreción de enzimas (Lee y col., 2004; Tamagawa y col., 2006).

Varios estudios reportan la influencia que tienen algunos sustratos (agar de trigo, agar de extracto de malta, agar dextrosa papa, agar de levadura) sobre la morfología y desarrollo de algunos hongos como en *M. conica* (Guler y ozkaya, 2009); algunos macrominerales (N, P y K) sobre el crecimiento y morfología micelilal en *H. fasciculare*, *P. velutina*, *P. impudicus* (Boddy y col., 1999) Así como, metales (Cd, Cu, Zn, Pb) que tienen efectos en la morfología de *S. delica Coker*, *D. carpophorus*, *A. alternata*, *S. tritici*, *T. viridae*, *R. arrhizus*, *A. bysexualis* (Gadd y col., 2001; Lundy y col., 2001; Ali, 2007) y en especial algunos compuestos xenobióticos como el benzimetil ftalato, dimetil benzibutil ftalato, dibutil ftalato, dietil hexil ftalato, pinturas (naranja II), pireno que influyen en el metabolismo y morfología de *P. ostreatus*, *P. chrysosporum*, *T. trogii* (Lee y col., 2003; Kim y Song, 2009; Sahrma y col., 2009; Pzdneyakova y col., 2010).

1.8. Morfología de colonias fúngicas

Las colonias de hongos filamentosos están formadas por una red de interconexiones, denominadas hifas. Las hifas son las unidades básicas de crecimiento de los hongos, involucradas en la asimilación de nutrientes, exploración y colonización de medio ambiente, mecanismos necesarios para su supervivencia (Falconer y col., 2009; Ferreira y Kato, 2003).

Cuando microorganismos crecen en medios de cultivos, ya sea sumergido o sólido exhiben diferentes morfologías (Grimm y col., 2005). Estos cambios morfológicos (forma, tamaño, y color de las colonias) se deben a varios factores ambientales (concentración de nutrimentos, temperatura, luz, etc.) que influyen en la forma de las colonias (Žnidaršič y col., 2000; Matsuura, 2002). Las estructuras miceliales pueden llegar a tomar formas rizomórficas, de espirales, de abanicos y difusas, esta última es también llamada colonia, especialmente cuando crecen en superficies de agar (Klein, 1996; Lundy y col., 2001; Moore, 2003).

Por otra parte, bajo condiciones de laboratorio el crecimiento micelial, se ve reflejado en el incremento celular: tasa de elongación de las puntas hifales, iniciación de ramificación, ángulos formados por las ramificaciones y frecuencia de ramificación (Goriely y col., 2008). El control de estos procesos depende de cuestiones genéticas y ambientales (Boswell y col., 2003). Cabe mencionar que la morfología de los hongos puede estar influenciada por la producción de enzimas y la tasa de degradación de ciertos compuestos (Kim y Song, 2009). La caracterización morfológica micelial es importante para estudios fisiológicos y procesos de fermentación (Packer y Thomas, 1990; Nopharatana y col., 2003).

La colonización y la exploración de suelos contaminados y otros sustratos sólidos se lleva a cabo gracias al modo de crecimiento filamentosos de los hongos (Matsuura, 2000; Gadd, 2001). Los hongos tienden a crecer sobre sustratos sólidos, usualmente en forma de colonia con bordes ramificados. La forma, el tamaño y el color de las colonias están determinados por parámetros ambientales (concentración nutrimental, temperatura, exoenzimas, etc.) (Bystrova y col., 2008). Así como, por el tiempo de exposición, concentración de compuestos tóxicos, estado fisiológico y propiedades del microorganismo (Baldrain, 2003;

Golovchenko y Polyanskaya, 2001; Schubert y col., 2010; Duarte y col., 2004; Lundy y col., 2001; Romero y col., 2011).

1.9. Composición de la pared celular de las hifas

La pared fúngica, es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas (Ponton, 2008). La estructura tri-dimensional del esqueleto se compone de ramificaciones β 1-3 glucano donde la quitina está enlazada (β 1-4) a un extremo no reductor de las cadenas laterales de β 1-3 glucano. Este núcleo fibrilar se compone también de polisacáridos amorfos que son solubles en álcali, entre los polisacáridos amorfos, se encuentran los β 1-6, glucanos, α 1-3 glucanos y mananos (Latgé y col., 2007).

1.9.1. Quitina

La quitina se sintetiza a partir de N-acetil glucosamina (NAG) por la enzima quitina sintasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. Una de sus funciones es dar rigidez a la pared celular. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. Representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20% (Peter, 2005).

1.9.2. Glucanos

El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%), también hay glucanos con enlaces β -1,6, β -1,4, α -1,3 y α -1,4 (Synytsya y col., 2009).

La pared celular de los basidiomicetos consiste en tres capas: la capa exterior con β -glucanos que son solubles en agua, la segunda con α -1,3-glucanos (S-glucano) solubles en álcali y la interior con glucanos insolubles en álcali con enlaces β -1,3 y β 1,6 (R-glucano), donde las microfibrillas de quitina están enlazadas. La insolubilidad del complejo alkil-glucano se debe a la presencia de enlaces covalentes entre el glucano y la quitina. (Shigekazu y col., 2004). Sietsma y Wessels (1977) reportaron que el S-glucano constituye el 45.5 % y la fracción R-glucano/quitina constituye el 57.5%.

1.10. Glicógeno en hongos

El glicógeno es el material de reserva energética de las células de los hongos y de los animales. Es muy similar al almidón, pero es un polímero muy ramificado compuesto de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1-4) y con ramificaciones aproximadamente cada 10 unidades formadas por enlaces glucosídicos α (1-6), éste es degradado por una fosforilasa, la cual elimina secuencialmente un residuo de glucosa a la vez de cualquier terminal no reductor, en forma de glucosa 1-fosfato para uso metabólico.

El glicógeno es almacenado en la base de los cuerpos fructíferos en varios estados iniciales del crecimiento (Niederpruem, 1970). En el desarrollo de los cuerpos fructíferos la acumulación del glicógeno en el estípote disminuye a medida que éste se incrementa en las laminillas. Primero se almacena en la base del estípote y posteriormente desaparece de esta zona conforme incrementa en el píleo (Matthews y Niederpruem, 1973). La acumulación y degradación de glicógeno es una parte integral de la meiosis y se encuentra disponible para ser utilizado para el desarrollo del cuerpo fructífero (Ji y Moore, 1993). Por otra parte, está involucrado en diversos aspectos de morfogénesis vegetativa (Jirjis y Moore, 1976).

1.11. Enzimas

1.11.1. Lacasas

Las lacasas (benzenodiol:oxidoreductasas, EC 1.10.3.2), pertenecen a la familia de Cu-oxidases azules y catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas con

la correspondencia reducción de oxígeno molecular a agua. Un mejor conocimiento de las enzimas del complejo lignolítico en la degradación de lignina permitirá un mayor aprovechamiento de este tipo de enzimas en los procesos de biorremediación de aguas y suelos contaminados. De este modo, la no-especificidad de los sistemas que degradan lignina genera la posibilidad de degradación de un amplio espectro de sustancias recalcitrantes que muestran similitudes estructurales con la lignina. Compuestos tales como cloro-fenoles, bifenoles policlorados, DDT, dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, haluros de alquilo, nitrotoluenos, colorantes azo y poliméricos pueden ser modificados o degradados en diferentes grados de extensión. Aplicaciones futuras pueden de esta forma aumentar el conocimiento de los diferentes mecanismos de degradación de moléculas xenobióticas catabolizadas por estos hongos de pudrición blanca (Kunamneni y col., 2007).

1.11.2. Quitinasas

Las quitinasas (EC 3.2.1.14), pertenecen a la familia de glicosil hidrolasas, catalizan la hidrólisis de la quitina, un homopolímero lineal de NAG. Las quitinasas juegan un papel importante en la fisiología y ecología en ecosistemas como reciclado de quitina para generar carbono y fuentes de nitrógeno. En bacterias las quitinasas juegan un papel importante en la nutrición por la degradación de quitina, el cual es usado como fuente de carbono y nitrógeno por la célula (Wiwat y col., 2002). En organismos que contienen quitina como los hongos; las quitinasas están involucradas en la germinación de esporas, en el crecimiento y ramificación hifal, desarrollo y reproducción micelial, estructura, septación celular, auto-lisis y parasitismo (De Marco y col., 2000; López y col., 2008).

La producción de quitinasa microbiana tiene un amplio espectro de aplicaciones tanto bioquímicas, alimentarias y de industrias químicas; tiene actividades antimicrobianas, anticolesterol y antitumoral. Ha sido usada para tratamientos de agua residual (Dahiya y col., 2006).

1.11.3. Proteasas

El papel que desempeñan las proteasas en los hongos de pudrición blanca, es la liberación de enzimas ligninolíticas de la pared celular de los hongos. Por otro lado, Dosoretz y cols.

(1990) postuló que una de las funciones de las proteasas producidas por estos hongos es reciclar el nitrógeno por descomposición de las proteínas liberadas en el medio celular por lisis (Kanmani y col., 2009). Los hongos de pudrición blanca representan una fuente de proteasas para aplicaciones biotecnológicas, alimentos, en industrias de detergentes y en procesos de biorremediación (Sabotić y col., 2007).

1.11.4. Glucanasas

Las glucanasas son enzimas que degradan β -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados por los productos de hidrólisis: (i) las exo- β -glucanasas, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y (ii) las endo- β -glucanasas, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace β de la cadena polisacáridica, liberando pequeños oligosacáridos. La degradación de los β -glucanos por los hongos se acompaña frecuentemente de la acción sinérgica de las endo- y exo- β -glucanasas (Gonzales y col., 2011).

Los (1-3)- β -glucanos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en las algas, hongos y levaduras, tienen una variedad de funciones biológicas. Conforman los componentes estructurales de la pared celular, actúan como hidratos de carbono y tienen una función protectora (Adams, 2004).

1.11. Procesamiento de imágenes

Las variaciones morfológicas de un objeto por su deformación o desarrollo, son instantes que de manera cualitativa son perceptibles por el ojo humano. Sin embargo, el poderlos capturar en forma digital a través de un sistema de visión por computadora (SVC) ofrece la posibilidad de preservar el instante y así mediante herramientas como el procesamiento de imágenes poder estudiar a detalle cada uno de esos cambios de manera cuantitativa, a través de distintos parámetros morfométricos como, por ejemplo, la dimensión fractal (Du y Sund, 2004; Mendoza y col., 2005).

El procesamiento digital de imágenes es el conjunto de técnicas que se aplican a las imágenes digitales con el objetivo de extraer información de ellas. Se confecciona un mapa en forma de cuadrícula de puntos o elementos de la figura (píxeles). A cada pixel se le asigna un valor tonal (negro, blanco, matices de gris o color), el cual está representado en un código binario (Acharya y col., 2005). Una imagen digital en escala de grises es una matriz de $M \times N$ elementos numéricos, cuyos posibles valores van del 0 (negro) al 255 (blanco), siendo este número la intensidad luminosa en el determinado punto o píxel (Pedreschi, 2004; Gusgsm, 2009; Boddy y Donnelly, 2008).

Una aplicación importante de la técnica de análisis de imágenes es la segmentación de una imagen que consiste en obtener una descripción concreta de sus bordes u otras regiones. Esto significa, identificar las características que describen tanto los contornos (detección de bordes) como las regiones donde ellos se concentran (extracción de regiones). Los métodos clásicos de segmentación de imágenes usualmente asumen los bordes como los extremos locales del gradiente de los niveles de gris, los cuales introducen dificultades en su detección debido al ruido introducido por la cámara, el muestreo o los mismos objetos que componen la imagen (Daffaut y col., 1999; Du y Sund, 2004; Mendoza y cols. 2005; Mery y col., 2005).

Pedreschi (2004), propuso 5 etapas para el procesamiento de imágenes.

1. **Adquisición de la imagen:** Es capturar y almacenar una imagen digital en una computadora. Considerando los efectos de la densidad de la iluminación, la orientación relativa de los objetos con respecto a la fuente de iluminación, ya que el nivel de grises de la imagen también dependen de estos parámetros y no solo de las características físicas superficiales del objeto.
2. **Preprocesamiento de la imagen:** se utilizan filtros digitales, para mejorar la calidad, eliminar ruidos e incrementar el contraste de las imágenes antes de que sean analizadas, adicionalmente en este paso las imágenes a color (RGB) son convertidas a escala de grises o a lo que se conoce como intensidad de la imagen.

3. **Segmentación de la imagen:** la imagen en escala de grises es utilizada para identificar zonas disyuntivas en la imagen con el propósito de separar la parte de interés del fondo de la imagen. Esta imagen segmentada es una imagen binaria que consiste solo de píxeles blancos y negros (“0” es blanco y “1” es negro representativos del fondo y del objeto respectivamente).
4. **Análisis de la imagen:** La segmentación detecta regiones de interés dentro de la imagen o características estructurales del objeto. Subsecuentemente el objetivo del análisis de la imagen es la medición de distintas propiedades tales como las geométricas (dimensión fractal, perímetro, etc.) así como características de cada región de la imagen.
5. **Clasificación de la imagen.** Durante la extracción de características, se analizan y asignan “clases”, las cuales representan todas las posibles regiones diferenciadas significativamente en la imagen.

Esta técnica puede detectar pequeños cambios en estructura como los que se presentan durante el crecimiento micelial de los hongos, dependiendo del equipo con el que se capturen las imágenes.

1.12. Fractales en la naturaleza

Las formas que se encuentran en el mundo real carecen de la simplicidad de una línea, un cuadrado o un cubo: poseen una riqueza de detalles, complejidad e irregularidad que no pueden describirse con la Geometría clásica, la Geometría de Euclides. Su descripción por medio de métodos tradicionales es insuficiente, lo que ha motivado la búsqueda de nuevas formas de analizar y describir objetos, ya sean reales o abstractos. Como respuesta a esta búsqueda, Benoît Mandelbrot, propuso conceptos que permitieron estudiar de manera alternativa, los objetos y así, de acuerdo a él mismo, esta geometría fractal: “permite describir muchas de las formas irregulares y fragmentadas que nos rodean, dando lugar a teorías coherentes, identificando una serie de formas que llamo fractales”. Fractal, deriva del Latín *fractus*, que significa quebrado o fracturado. Es un elemento de la naturaleza que

puede ser descrito mediante la *geometría fractal*. Las nubes, las montañas, el sistema circulatorio, las colonias miceliales y bacterianas así como, las líneas costeras o los copos de nieve son fractales naturales. Esta representación es aproximada, pues las propiedades atribuidas a los objetos fractales ideales, como el detalle infinito, tienen límites en el mundo natural (Mandelbrot, 1977).

Por otra parte, a un objeto geométrico fractal se le atribuyen las siguientes características:

- ❖ Demasiado irregular para ser descrito en términos geométricos euclídeos tradicionales.
- ❖ Posee detalle a cualquier escala de observación. Esta propiedad implica que en las ocasiones en las que la fractalización o el grado de detalle de la geometría tienda a infinito, será imposible medirla. Esto ha hecho que en la literatura matemática se les llame curvas monstruo, ya que la longitud de una curva fractal iterada hasta el infinito, contenida en un área finita, es infinita, algo que para la geometría tradicional es en sí mismo una paradoja.
- ❖ Su dimensión de Hausdorff-Besicovitch es estrictamente mayor que su dimensión topológica. Esta propiedad teórica implica que su tamaño, ya sea en longitud o superficie, dependiendo de la dimensión que tenga el fractal, es mayor de lo que se podría esperar de una forma euclidiana. Esta dimensión Hausdorff-Besicovitch es una forma de medir la dimensión fractal o la “fragmentación” de la geometría a estudiar y nos da una idea de cómo ocupa el espacio que la contiene.
- ❖ Posee autosimilaridad, ya sea exacta, cuasi-autosimilaridad o estadística (Falconer, 2003).

Existen dos tipos de fractales de objetos fractales: los matemáticos o determinísticos y los naturales o aleatorios. Los primeros son los generados por ecuaciones y formas geométricas que son iteradas a diferentes escalas; y los segundos al igual que los fractales matemáticos, presentan la misma estructura a diferentes escalas de observación; pero se diferencian en que el intervalo de escalas de observación es limitado; en los fractales matemáticos la escala puede ser infinita mientras que en los naturales la escala a la que se conserva su

propiedad es autosimilitud es finita (Chanona y col., 2001; Halley y col., 2004).

A partir de lo anterior, un fractal natural se define como una figura en la cual la autosimilitud solo se mantiene en un intervalo dado de amplificación; adicionalmente, la evaluación de la similitud entre diferentes niveles de amplificación se hace estadísticamente, por lo cual es usual hablar de autosimilitud estadística o autoafinidad (Barletta y Barbosa-Casanovas, 1993).

1.13. Dimensión fractal

La medición de la dimensión fractal ha sido utilizada para proporcionar una descripción cuantitativa de los cambios morfológicos del desarrollo de colonias de hongos filamentosos (Dong, 2000; Lundy y col., 2001). Además de proporcionar información sobre los mecanismos implicados en el desarrollo del micelio fúngico en particular para comprender las relaciones que se desarrollan entre los hongos y sus sustratos (Crawford y col., 1993; Boddy y Donnelly, 2008; Papagianni y col., 2006). Existen diferentes métodos para el análisis fractal como se muestra en la Tabla. 2.

Tabla 2. Métodos para el análisis fractal de colonias fúngicas

Microorganismo	Método	Substrato	Df	Referencia
<i>Achlya bisexualis</i>	Box counting	Cu, Co, Hg, Zn	Incremento en los valores de Df	Lundy y col., 2001
<i>Isilocybe cubensis</i>	Box counting	Agar levadura de malta	1.73, 1.87	Lucić y Kratky, 2004
<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	Box-counting		Correlación directa entre el crecimiento de las hifas y la dimensión fractal	Barry, 2010
<i>Talaromyces wortmannii</i>	Box-counting	Hidrocarburos aromáticos	Incremento en los valores de DFM y DFS.	Romero y col., 2011

<i>Resinicium bicolor</i>	Box-counting	Agar de malta	1.10 a 1.4	Zakaria y Boddy, 2002
---------------------------	--------------	---------------	------------	-----------------------

Por otra parte, una de las características más importantes es que permite la caracterización de irregularidades que no pueden tratarse mediante la geometría euclidiana. En geometría de fractales, la dimensión fractal (D_f), es una cantidad estadística que da una idea de cuán completamente parece llenar un fractal el espacio conforme se amplía el primero hacia escalas más y más finas (Jones y Lonergan 1997; Barry y col., 2009).

Esta nueva magnitud fraccionaria cambio el esquema de dimensiones enteras o euclidianas (Mandelbrot, 1997), las cuales se refiere al número de coordenadas necesarias para especificar la posición de un objeto en el espacio (Chanona y col., 2001); de esta manera la dimensión de un punto es cero, de una línea es uno, de una superficie es dos y de un volumen es tres; en el caso de la dimensión fractal, esta regla no se cumple. Los objetos fractales tienen la característica de ser complejos, de presentar autosimilitud a diversas escalas de observación, no se pueden derivar o integrar y son independientes de la escala de medición (Kenkel y Walker, 1996; Barry y col., 2009).

Cuando se determina la D_f se utiliza la relación logarítmica en un grafico de \ln de perímetro, \ln de área, o de \ln de volumen según sea el caso, contra \ln de la escala de observación ($\ln L$), lo que se conoce como el gráfico de Richardson (Fig.5). Para objetos regulares el valor de las pendientes serán números enteros y tomarán los mismos valores que la dimensión euclidiana, sin embargo, para los objetos irregulares esas pendientes darán como resultado la dimensión fractal (Jiménez-Junca, 2005).

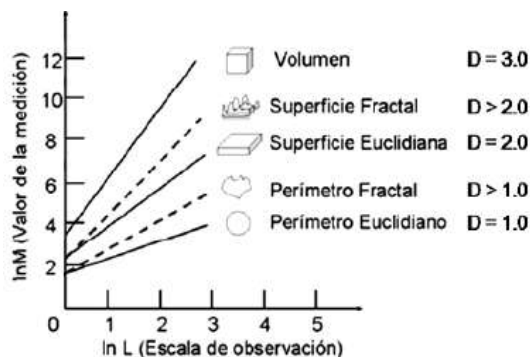


Fig. 5. Gráfico de Richardson

La D_f se puede definir en términos lineales, planares o volumétricos obteniéndose las D_f de

perímetro, área y volumen o superficie (Chakraborti y col., 2003). Así, la dimensión fractal mide el grado de irregularidad de contornos o fronteras; la dimensión de una línea recta o de perímetro de un círculo perfecto es 1, pero si la línea es irregular o accidentada que pueda llenar el área del dibujo, la D_f será mayor a la unidad (Peleg 1993).

La dimensión fractal de área (D_A) se define por la relación entre el área proyectada y la longitud característica del objeto. Para el caso de un círculo perfecto la $D_A=2$, pero para el caso de un objeto fractal que presentan menor compactación que el círculo y que tiene ramificaciones y/o espacios en su área tendrá una dimensión fractal D_A menor a 2.

Por su parte, la dimensión fractal de superficie (DFs) se ha utilizado para cuantificar el grado de rugosidad o irregularidad superficial (textura) de los objetos; de esta manera una superficie fractal tiene valores mayores a 2 sin llegar a ser un volumen de un cuerpo geométrico perfecto (Lundahl y col., 1986).

1.14. Método de Conteo de Caja o *Box-Counting*

Una de las diferentes versiones del cálculo de la dimensión fractal es el llamado método de box-counting que se relaciona con el concepto de estructura auto-similar. La metodología consiste en sobreponer a la estructura a ser analizada en una rejilla con una malla de tamaños diferentes, ϵ formando un recubrimiento de cajas. El número de cajas que contienen valores de la estructura a caracterizar el cual varía con el valor de ϵ escogido (Donnelly y col., 1995; Lecault y col., 2007; Papagianni, 2006) (Fig. 6).

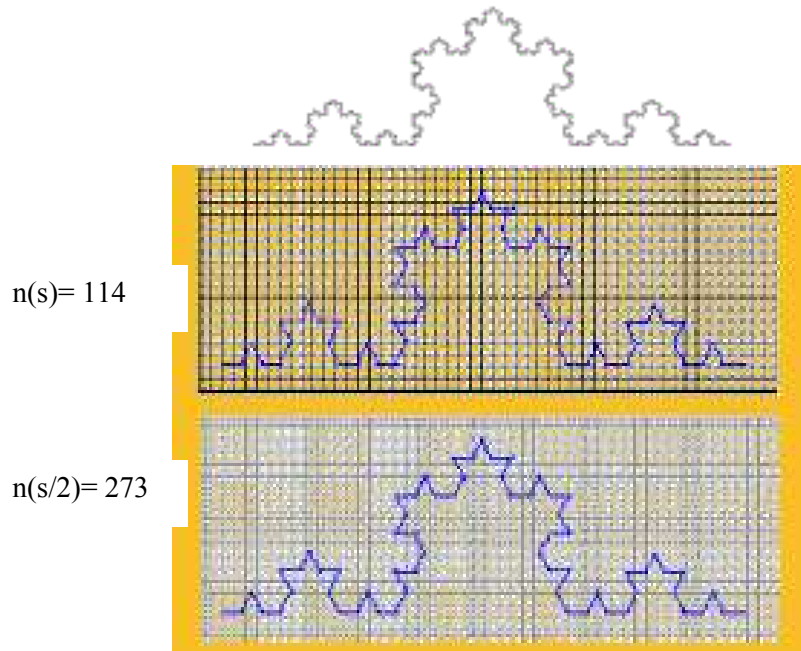


Fig. 6. Método de "box-counting" cubrimientos a diferentes escalas

Para realizar el correspondiente cálculo de la dimensión fractal se procede a contar el número de cajas (N), a diferentes escalas (Fig. 6) la variación de escala de un paso al siguiente es dependiente del tamaño de la imagen y de los múltiplos de ese tamaño. El valor de la dimensión fractal corresponde a la pendiente de la representación $\text{Log } N$ Vs. $\text{Log } N(s)$ (Fig. 7). El método box-counting se aplica dividiendo el lado L de la imagen en s cajas de igual tamaño $s=L/\hat{a}$. Estas varían desde la dimensión máxima posible del lado L hasta la unidad mínima de la imagen que corresponde a un píxel (Obert y col., 1990; Daffaut y col., 1999; Papagianni, 2006).

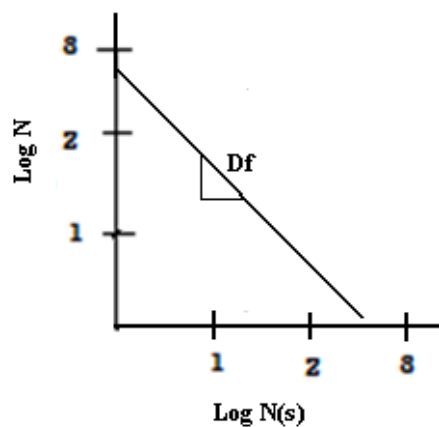


Fig. 7. Regresión $\text{Log } N$ Vs. $\text{Log } N(s)$. La pendiente de esta línea es la D_f .

2. ANTECEDENTES

Guler y Ozkaya (2009) Estudiaron la tasa de crecimiento radial, características morfológicas y pigmentación del micelio en el desarrollo micelial de *Morchella conica*, adicionando diferentes concentraciones de glucosa (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25%) a diferentes medios de cultivo (agar de trigo, agar extracto de malta, agar dextrosa papa y agar de levadura). El periodo de desarrollo del micelio sobre agar de trigo fue de 4 días, observándose un micelio muy delgado, en agar extracto de papa la invasión micelial fue a los 7 días, mientras que en agar extracto de malta y en agar de levadura fue a los 5 días. El desarrollo micelial sobre agar papa dextrosa se observó denso y circular, mientras que en extracto de malta y agar de levadura el micelio fue rizomórfico.

Kim y Song (2009) Estudiaron la secreción de enzimas degradadoras y la capacidad de degradación sobre el efecto en el tamaño del pellet de *Pleurotus ostreatus*. Observaron que el tamaño del inóculo se vio afectado por el volumen de inóculo, medio de cultivo, pero el factor velocidad de agitación fue el más importante. La agitación de 100 rpm los pellets fueron de mayor tamaño y la actividad de lacasa fue superior, en comparación con la agitación de 150 rpm donde los pellets fueron más pequeños. Por otra parte, la tasa de degradación de benzimidil ftalato y dimetil benzilbutil ftalato fueron mayor con la agitación de 150 rpm, indicando la participación de otras enzimas aparte de la lacasa. La actividad de la esterasa, la cual, cataliza compuestos nonilfenolicos antes de la reacción de las enzimas ligninolíticas, fue mayor en el medio de cultivo con pellets pequeños.

Ali (2007) Estudio el efecto de metales pesados esenciales (Zn) y no esenciales (Cd y Pb) sobre la morfología de *Saprolegnia delica* Coker y *Dictyuchus carpophorus*. El plomo, fue uno de los metales pesados que mostro tener efecto en la inhibición de la extensión radial de las hifas de ambas especies de hongos. *D. carpophorus* a altas concentraciones de Cd, su morfología se presentó curvo. En cuanto al Zn, las diferentes concentraciones de este metal, estimularon la elongación esporangial en ambos hongos.

Remlein-Starosta (2003) Evaluó la influencia del cadmio sobre el crecimiento, la morfología y la esporulación de los hongos; *Alternaria alternata*, *Septoria tritici* [= *Mycosphaerella graminicola*], *Epicoccum purpurascens* [= *E. nigrum*], *Fusarium avenaceum* [= *Gibberella avenacea*], *Bipolaris sorokiniana* [= *Cochliobolus sativus*]. Todas las especies estudiadas difieren en respuesta al cadmio. Se observó retardo en el crecimiento radial del micelio, cambios de pigmentación y la inhibición o la pérdida de esporulación. *S. tritici* fue el hongo más sensible al cadmio.

La plasticidad fenotípica del hongo *Aureobasidium pullulans* fue examinada en el contexto de las observaciones sobre los cambios morfológicos de la colonia. La variación en la forma de la colonia dependió; 1) de la fuente de carbono (azúcar y alcohol-azúcar), usados como medios de crecimiento, 2) edad de la colonia, 3) temperatura de incubación, 4) ciclo de luz y 5) tipo de sustrato. Las influencias epigenéticas sobre el fenotipo del hongo, sugieren ser la causa de los cambios en la forma de la colonia (Slepecky y Starmer, 2009).

Nazareth y Marbaniang (2008) Estudiaron diferentes morfotipos de *Penicillium* halotolerantes en presencia de metales pesados (plomo, cobre, y cadmio). El plomo fue el metal más tolerado por los diferentes morfotipos (monovérticilado, bivérticilado, y terverticilado), causando menor variación en características morfológicas, mientras que el cadmio fue el más tóxico, causando variaciones morfológicas. Cabe mencionar que el morfotipo terverticilado fue el más tolerante a todos los metales pesados.

Gadd y cols. (2001) Estudio el efecto de metales tóxicos sobre el crecimiento de la colonia y distribución de la biomasa de *Trichoderma viridae* y *Rhizopus arrhizus*. Los tratamientos se realizaron en medios de cultivos sólidos conteniendo 0.1 mg de Cd, Cu y Zn. Se observó un decrecimiento en la expansión radial para ambas cepas. Sin embargo, la longitud del micelio y el patrón de ramificación se vieron afectados, en condiciones con bajos nutrientes. *T. viridae* muestra un decrecimiento en la longitud del micelio y número de ramificaciones en respuesta al Cu.

Realizaron un estudio basado en la descripción del desarrollo micelial de *Hypholoma fasciculare*, *Phanerochaete velutina* y *Phallus impudicus* en relación a los efectos de la concentración extracelular de macronutrientes N, P, K y el estado nutricional endógeno del inoculo. Observaron diferencia micelial entre especies, estas alteraciones se debieron al

estado nutrimental del inoculo. Las diferencias miceliales, fueron determinadas usando dimensión fractal (método de conteo de caja), incluyendo la extensión total de las hifas y cobertura. Estos tres parámetros son utilizados en conjunto debido a que proporcionan información diferente. Concluyendo que las medidas son tan objetivas que no pueden describir funciones como es el patrón de ramificación (Boddy y col., 1999).

Se realizaron estudios morfológicos de *Achlya Bysexualis*, este organismo fue expuesto a diferentes medios de cultivo conteniendo Cu, Co, Hg, Zn y Cd a concentraciones de 0.05 y 3 mM en todos los casos. Para todos los metales se un decrecimiento en el área micelial y extensión radial. En cuanto, a la dimensión fractal del borde incremento en presencia de Cu, Co y Hg. Cabe mencionar que, en presencia de 3 mM de Hg las hifas mostraron un crecimiento en forma de espiral, sin embargo, en Zn y Cd no tuvo ningún efecto en la dimensión fractal del borde (Lundy, 2001).

Caracterizaron la macro-micro estructura del desarrollo colonial cinético de *Rhizopus oligosporus* a través del procesamiento de imagen y geometría fractal. Las imágenes de las colonias fueron utilizadas para la detección de la dimensión fractal del borde (crecimiento frontal). El borde es representado por aquella zona cubierta por un 80% de la imagen con una DF igual o mayor al 97% de la Df máxima. Las características evaluadas fueron: crecimiento radial, el número de puntas del borde. Dos acontecimientos de diferente magnitud y oscilante se detectaron en el crecimiento frontal: la ramificación y el incremento de la longitud de las hifas. (Camacho-Díaz y col., 2010).

La biodegradación y la actividad estrogénica de dibutil ftalato (DBF) fue caracterizada por hongos de pudrición blanca, *Phanerochaete chrysosporum*, *Trametes versicolor*, *Daldinia concéntrica*. Los tres hongos presentan alta resistencia al DBF con una ligera inhibición dependiendo de la concentración del tóxico. *D. concéntrica* mostró resistencia a una alta concentración de DBF (500 ppm) y su degradación fue más del 90 % después del primer día de incubación. Durante una semana los efectos estrogénicos del DBF después del tratamiento con el sobrenadante de *D. concéntrica* desapareció (Lee y col., 2004).

Levin y col., 2003. Analizaron la habilidad de *Trametes trogii* para degradar nitrobenzeno y antraceno (250 y 500 ppm). El 90 % de los contaminantes fueron removidos, entre los 12 y 24 días. La estimación enzimática indica una alta actividad enzimática de lacasa, la cual

podría estar implicada en la degradación de este compuesto xenobiótico.

Sharma y col., 2009. Estudiaron la decoloración de la pintura azo, Naranja II, por *Phanerochaete chrysosporum*. A los 7 días fue removido el 85% (decoloración optima fue a los 5 días a 28-30°C con un pH de 5.0) en medio de cultivo líquido. La habilidad de decoloración fue correlacionada con la actividad enzimática ligninolítica, donde la Mn-peroxidasa presentó mayor actividad al 7mo día con 265 U/l.

Estudiaron la degradación de pireno por *Pleurotus ostreatus* D1; este fue cultivado en medio Kirk's, donde se observa que fue metabolizado el 65,6% después de 3 semanas con acumulación de pireno 4,5-dihidriol. En este proceso solo se observa la producción de lacasa en un medio rico para basidiomicetos. El pireno se metaboliza en un 82,8% en menos de 3 semanas sin acumulación de pireno 4,5-dihidriol. El ácido ftálico y fenantreno fueron identificados como los metabolitos producidos a partir de la degradación del pireno. Cabe mencionar que durante el metabolismo del pireno en medio rico para basidiomicetos se observó la presencia de lacasa, tirosina y peroxidasa versátil. Los resultados indican que las enzimas lacasa peroxidasa y versátil son necesarios para la completa degradación de pireno (Pozdnyakova y col., 2010).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirá alguna relación entre la dimensión fractal, desarrollo y metabolismo en colonias de *Pleurotus ostreatus* en medio sólido a diferentes concentraciones de di (2-etilhexil) ftalato (DEHF)?

4. JUSTIFICACIÓN

Los hongos de pudrición blanca constituyen un interesante grupo de organismos con gran potencial biotecnológico debido a su habilidad para degradar el polímero de lignina y compuestos aromáticos estructuralmente relacionados, tal es el caso de *Pleurotus ostreatus*.

El crecimiento del micelio fúngico de *P. ostreatus* tiende a presentarse de forma fractal, lo que permite realizar una descripción cuantitativa de los cambios morfológicos del desarrollo de colonias de hongos filamentosos. Por lo anterior en este estudio se evaluó la dimensión fractal de este organismo después de crecer en ftalatos (compuesto fenólico). Esta información contribuye al conocimiento sobre la relación entre la morfología de la colonia, el crecimiento del hongo y la degradación de este compuesto.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar la dimensión fractal de las colonias de *Pleurotus ostreatus* desarrolladas en medios conteniendo dos diferentes concentraciones de DEHF (500 y 1000 mg/L).

5.2. Objetivos Particulares

- Analizar la dimensión fractal de la periferia de las colonias de *Pleurotus ostreatus* desarrolladas sobre dos diferentes concentraciones de DEHF (500 y 1000 mg/L).
- Evaluar la velocidad de crecimiento radial de las colonias de *Pleurotus ostreatus* desarrolladas sobre dos diferentes concentraciones de DEHF (500 y 1000 mg/L).
- Evaluar la biomasa de las colonias de *Pleurotus ostreatus* desarrolladas sobre dos diferentes concentraciones de DEHF (500 y 1000 mg/L).
- Determinar en *Pleurotus ostreatus* el contenido de glicógeno, glucano, así como la actividad enzimática de proteasas, glucanasas, quitinasas y lacasas.
- Correlacionar la velocidad de crecimiento radial, biomasa, actividad enzimática y dimensión fractal de las colonias de *Pleurotus ostreatus* desarrolladas sobre dos diferentes concentraciones de DEHF (500 y 1000 mg/L).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Medios y condiciones de cultivo

El hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (ATCC 32783) fue reactivado en cajas Petri conteniendo agar extracto de malta, para después inocular en los 4 diferentes medio de cultivo por separado, que son:

- 1) Medio con sales (SM)
- 2) Sales minerales más glucosa (10 g/L) (SM+Gluc)
- 3) Sales minerales más DEHF a una concentración de 500 mg/L (SM+500 mg/L DEHF)
- 4) sales minerales más DEHF a una concentración de 1000 mg/L (SM+1000 mg/L DEHF)

El medio con sales minerales contiene lo siguiente:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mg/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CaH}_4(\text{PO}_4)\text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.2

En todos los estudios se empleó un inóculo (4 mm de diámetro) obtenido de la periferia de una colonia de *P. ostreatus*, crecida en un medio de cultivo conteniendo SM (sin fuente de carbono). Cabe mencionar, que los diferentes medios de cultivo fueron sometidos a una temperatura de 28 °C por 7 días.

6.2. Análisis de dimensión fractal de la periferia de *P. ostreatus* por el método de conteo de caja.

6.2.1. Preprocesamiento de imágenes

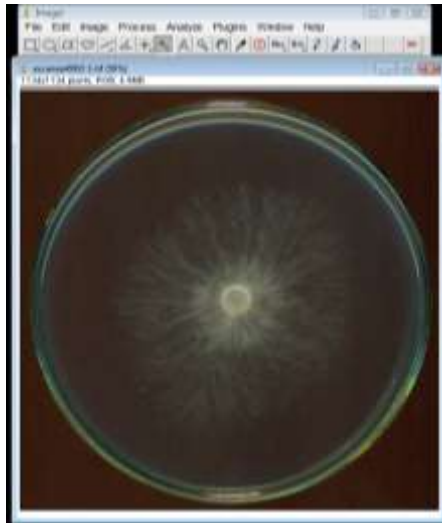
De acuerdo a Pedreschi (2004), el primer paso es:

- a) La captura de la imagen: Las imágenes de las colonias de *P. ostreatus* fueron obtenidas cada 24 h con ayuda de un escáner (HP ScanJet G3110, China) acoplado a una PC (Fig.10). Se capturaron 15 imágenes de 5 cajas Petri, siendo el número de replica para cada medio de cultivo, el tamaño de la imagen en formato digital fue de 1134 x 1134 píxeles. Las imágenes capturadas fueron guardadas en formato TIF. La escala utilizada corresponde 1cm= 118.57 píxeles.

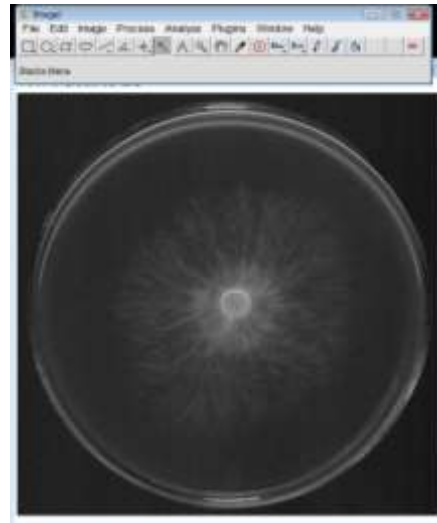


Fig. 8. Captura de imágenes de colonias de *P. ostreatus* a través de un escáner acoplado a una PC

- b) Preprocesamiento de la imagen: En este paso se utilizó el software Image J 1.43u, donde cada una de las imágenes a color (RGB) fueron transformadas a escala de grises (8 bits) (Fig. 11).



a)



b)

Fig. 9. Transformación de una imagen a color (a) a escala de grises (b)

c) Segmentación de la imagen: Antes de obtener la segmentación del borde la colonia, las imágenes fueron transformadas de escala de grises a imágenes binarizadas (blanco y negro) (Fig. 13), con ayuda de la herramienta Threshold (SM, SM+Gluc, SM+500, SM+1000 mg/L de DEHF con 57/183, 64/191, 61/171, 64/19, respectivamente). La segmentación del borde de la colonia fue de manera manual (Fig. 12, 13, 14).

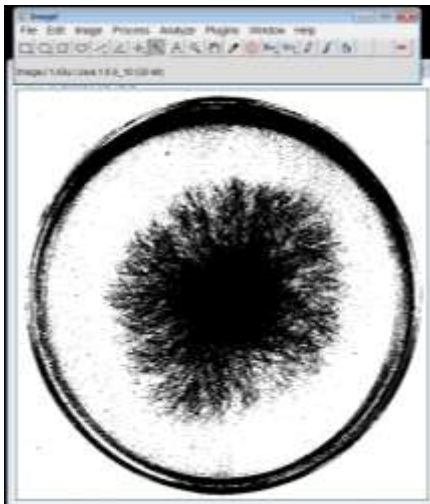


Fig. 10. Imagen de una colonia de *P. ostreatus* binarizada

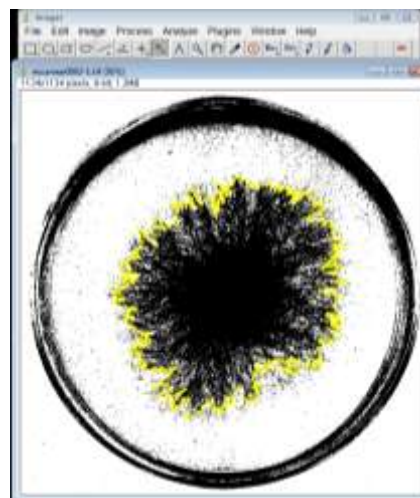


Fig. 11. Selección de borde en una colonia de *P. ostreatus*

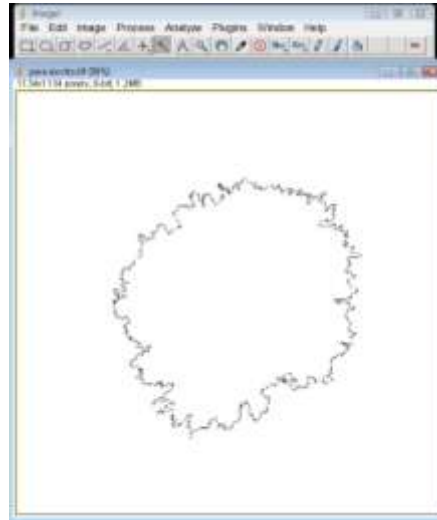


Fig. 12. Borde segmentado de una colonia de *P. ostreatus*

d) Análisis de imágenes: Una vez obtenidas las imágenes con el borde de la colonia seleccionado, se procedió a utilizar la herramienta “Fractal Box Counter” del software Image J 1.43u (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, USA,) (Rasband, Abril 2010) (Fig. 15) para determinar la dimensión fractal. La dimensión fractal estimada en Image J 1.43u se realizó por el método de conteo de cajas (Crawford y col., 1993; Vicsek, 1989, Obert y col., 1990, Papagianni, 2006) (Fig. 16).

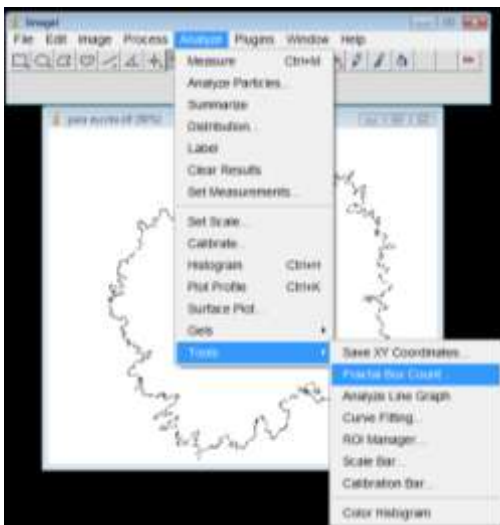


Fig. 13. Procedimiento con fractal box counter a través del programa Image J 1.43u

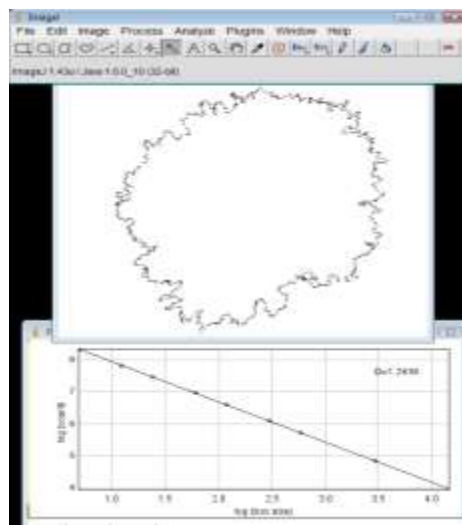


Fig. 14. Determinación de la Df en una colonia de *P. ostreatus*

6.3. Evaluación de la velocidad de crecimiento radial de las colonias de *P. ostreatus*

La velocidad de crecimiento radial (V_r) se evaluó en colonias de *P. ostreatus* desarrolladas sobre diferentes medios de cultivo (Fig. 8), en replicas de 10 para cada medio de cultivo. Las mediciones del crecimiento micelial se realizaron cada 24 h con ayuda de un vernier (Mitutoyo CD-6" CS, Japón) y la V_r se determinó empleando la ecuación lineal en la fase logarítmica (Sánchez y col., 2005; Sastre-Ahuatzi y col., 2007; Membrillo y col., 2008).



Fig. 15. Proceso de evaluación de la V_r en una colonia de *P. ostreatus*

6.4. Evaluación de biomasa de las colonias de *P. ostreatus*

La biomasa se determinó por el método de peso seco cada 24 h (Fig. 9), con una réplica de 5 para cada medio de cultivo. El método consiste en separar la biomasa del agar en baño maría. Esto es, poner la muestra en un matraz con 200 ml de agua destilada y someter a 60°C por 15 min para después, la muestra filtrarla a través de papel filtro prepesado (Whatman No 2) (a). Una vez obtenida la biomasa en el papel filtro, se puso a secar a 80°C hasta peso constante (b). Después de 24 h se pesó el papel filtro con la biomasa seca y por diferencia de peso se determinó la biomasa expresada en mg (c) (AOAC, 1990, Ashok y col., 2001).

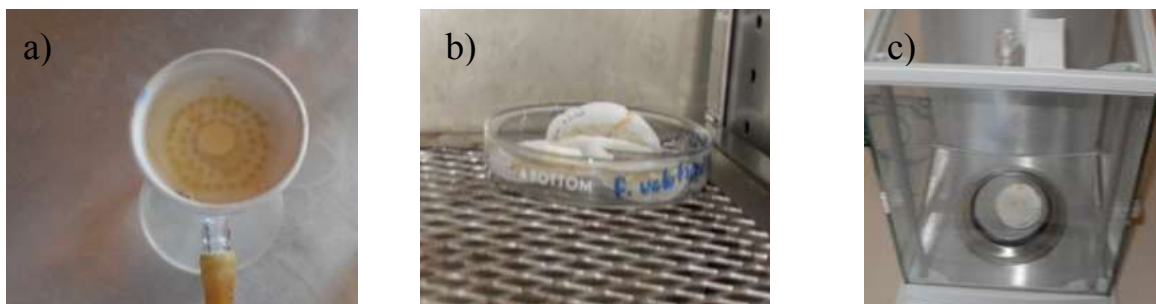


Fig. 16. Proceso de evaluación de la biomasa en una colonia de *P. ostreatus* desarrollada sobre diferentes medios de cultivo

6.5. Análisis enzimático de las colonias de *P. ostreatus*

La obtención del extracto crudo enzimático (ECE) del micelio de *P. ostreatus*, se obtuvo por lisis celular de los diferentes medios de cultivo. En un tubo ependorff con volumen de agua conocido, el macerado se centrifugo a 15 000 rpm por 10 min a una temperatura de -2 °C; las paredes celulares del hongo se sedimentaron y se consideró al sobrenadante como el ECE (Silva y col., 2005; Revankar y Lele, 2006; Kalmış y col., 2008).

6.5.1. Determinación del contenido de glicógeno intracelular

Para determinar la cantidad de glicógeno se determinó el contenido de azúcares totales por el método de Antrona (Trevelyn y Harrison, 1952). A 100 μ l de la dilución 1:200 del ECE se le agregó 2 ml del reactivo de Antrona (Sigma). Se calentó a temperatura de ebullición por 10 min y después de enfriarse se leyó la absorbencia a 625 nm. También se cuantificó la cantidad de azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido dinitro-salícilico), a 100 μ l de ECE y 900 μ l de agua destilada se le agregó 2 ml del reactivo DNS. Se calentó a una temperatura de ebullición por 5 min y después de enfriarse se leyó la absorbencia a 575 nm. Se preparó una curva de calibración con glucosa. El contenido de glicógeno se calculó como la diferencia entre el contenido de azúcares totales menos el de los azúcares reductores.

6.5.2. Determinación del contenido de glucanos de la pared celular

Los glucanos de la pared del hongo se prepararon en dos diferentes fracciones: soluble e insoluble en álcali. Los glucanos solubles en álcali se prepararon al solubilizar las paredes celulares en hidróxido de potasio (KOH) 1N, por 18 h a 25 °C. Se centrifugó a 15 000 rpm por 3 min a -2 °C. El precipitado (R-glucano) se solubilizo con ácido fórmico concentrado caliente y se cuantifico por el método de Antrona. Al sobrenadante se le ajusto el pH a 5 con ácido acético (Sigma) y se centrifugo, el precipitado (S-glucano) se solubilizo con KOH 1N y se cuantificó por el método de Antrona (Wessels, 1969).

6.5.3. Determinación de proteasas intracelulares

La actividad de proteasas se determinó por la cuantificación de aminoácidos aromáticos liberados en la mezcla de reacción (450 µl caseína al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0 y 50 µl de ECE), incubada a 35 °C por 15 min la reacción de detuvo por la adición de 750 µl de ácido tricloracético (Baker) al 5%. La mezcla se centrifugo a 15 000 rpm. Por 15 min a temperatura de refrigeración. Se leyó la absorbencia del sobrenadante a 280 nm. Una unidad de actividad de proteasa es la unidad de enzima que libera aminoácidos aromáticos provocando un cambio de 1.0 unidad en la absorbencia por min de incubación (Kunitz, 1947).

6.5.4. Determinación de lacasas intracelulares

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustrato de 2,6-dimetoxifenol (Sigma) 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0. La mezcla de reacción (475 µl de sustrato, 50 µl de ECE) se incubo a 39 °C por 15 min. Se leyó la absorbencia 468 nm. Una unidad de actividad de lacasas es la cantidad de enzima que provoca incrementos de 1.0 unidad en la absorbencia por min de incubación (Ardon y cols, 1998).

6.5.5. Determinación de glucanasas intracelulares

La actividad de glucanasas se cuantificó evaluando el incremento de azúcares reductores liberados en la mezcla de reacción (500 μ l laminarina (Sigma) al 0.7 %, 450 μ l de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.0 y 50 μ l de ECE) incubada a 30 °C por 90 min. La reacción se detuvo por la adición de 2 ml de DNS. Se leyó la absorbencia a 575 nm (Sharma y Nakas, 1978) una UI de actividad de glucanasas, es la unidad de enzima que libera 1 μ M de producto por min. Se preparó una curva de calibración con glucosa (Téllez-Téllez, 2002).

6.5.6. Determinación de quitinasas intracelulares

La actividad de quitinasas se cuantificó evaluando la concentración de NAG liberada en la mezcla de reacción (900 μ l de quitina (Sigma) al 1% en buffer de acetatos 0.1 M pH de 5 y 100 μ l de ECE) incubada a 37 °C por 4.5 h. La reacción se detuvo por la adición de 870 μ l de ρ -dimetilaminobenzaldehído (Téllez-Téllez, 2002). Se leyó la absorbencia a 585 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Análisis de dimensión fractal del borde de las colonias de *P. ostreatus*

La Df del borde de las colonias crecidas en el medio de cultivo conteniendo SM, presentó mayor irregularidad (1.20), esto debido a la falta de nutrientes y por consiguiente el estrés; en comparación con el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc, donde la Df se mantiene (1.28) (Fig. 19). Por otro lado, las colonias crecidas bajo las dos concentraciones de ftalato (500 y 1000 mg/L) presentan una Df similar (1.14 y 1.14, respectivamente). Esto podría indicar, que el hongo está empleando como fuente de carbono el plastificante, dado a que el comportamiento es similar al de SM+Gluc.

Matsuura (2000) reportó que las colonias de *Aspergillus nidulans* crecidas en un medio de cultivo rico, presentó un borde homogéneo y liso. En general, las colonias crecidas en medios de cultivo sólidos ricos en nutrientes presentan un borde homogéneo. En contraste, con las colonias crecidas en medios de cultivo limitados de nutrientes, donde el borde se presenta en forma irregular. Los mecanismos regulatorios durante el desarrollo de la colonia no solo dependen de la especie, sino también, de las condiciones del cultivo para su desarrollo (Lundy y col., 2001; Walter y col., 2005). Slepecky y Starmer (2009) reportaron la plasticidad fenotípica del hongo *Aureobasidium pullulans* y sugieren que la influencias epigenéticas pueden ser la causa de los cambios de la forma de la colonia. Romero y col. (2011) estudiaron parámetros fractales en *Talomyces wortmanni* en presencia de hidrocarburos aromáticos (antraceno, benzeno-pireno, naftaleno). Mencionan que al incrementar la concentración de los contaminantes hay un incremento en los valores de DMF y DSF en los pellets; mismos que presentan una morfología alargada.

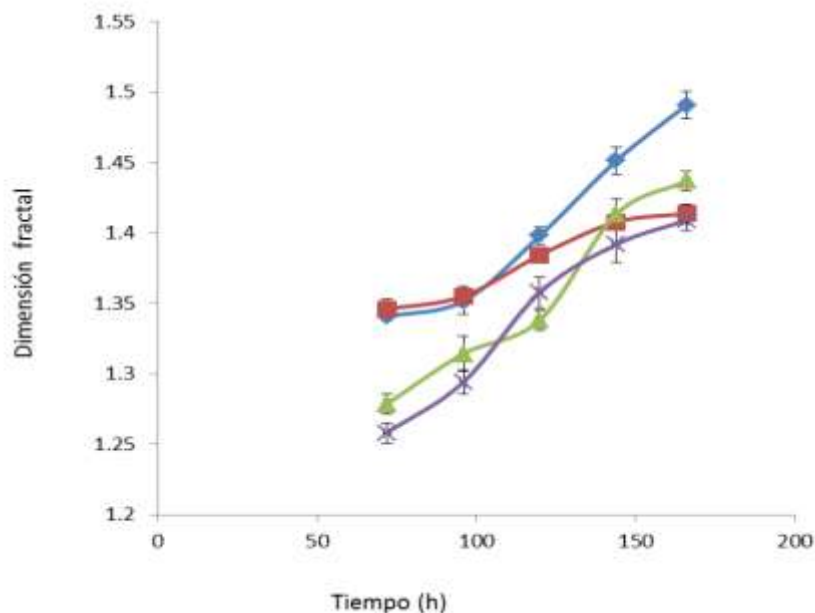


Fig. 17. Dimensión fractal de *P. ostreatus* obtenida sobre diferentes medios de cultivo SM (◆), SM+Gluc (■), Sm+500 mg/L DEHF (▲), SM+1000 mg/L DEHF (×).

7.2. Evaluación de velocidad de crecimiento radial de *P. ostreatus*

En la Fig. 17. se presentan los resultados obtenidos de la V_r de *P. ostreatus* en los 4 diferentes medios de cultivo. Se observó una menor V_r en el medio de cultivo adicionado con DEHF a una concentración de 1000 mg/L en comparación con aquella obtenida en el medio de cultivo conteniendo SM+500 mg/L de DEHF (0.094 y 0.18 mm/h, respectivamente), esto sugiere que concentraciones elevadas del tóxico podrían inhibir el crecimiento micelial. Cabe mencionar, que se observó una V_r similar en los medios de cultivo conteniendo SM+500 mg/L de DEHF y SM+Gluc (0.18 y 0.20 mm/h, respectivamente). El medio adicionado con glucosa fue el medio de cultivo que presentó una mayor V_r (0.20 mm/h), en contraste, con el medio conteniendo SM donde se observó una menor V_r (0.095 mm/h) en relación a todos los medios de crecimiento.

Bezzi y Ciliberto (2004) reportaron que los hongos que crecen en un medio rico con nutrimentos, favorece el número de ramificaciones y la longitud del micelio de manera

exponencial, en comparación con un medio pobre donde se observa inhibición del hongo durante el crecimiento. Ali (2007) reportó inhibición de la extensión radial de las hifas de *D. carpophorus* a altas concentraciones de Cd. Remlein-Starosta (2003) observó retardo en el crecimiento radial del micelio e inhibición de la esporulación en *S. tritici* por el efecto del Cd.

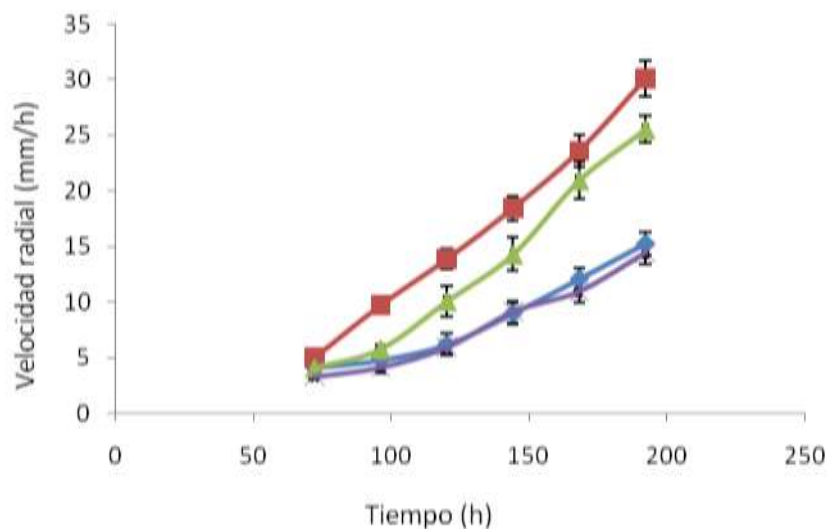


Fig. 18. Velocidad de crecimiento radial de *P. ostreatus* sobre diferentes medios de cultivo SM (—▲—), SM+Gluc (—■—), SM+500 mg/L DEHF (—▲—), SM+1000 mg/L DEHF (—■—).

7.3. Biomasa de *P. ostreatus* obtenida en los diferentes medios de cultivo

Los resultados de la biomasa obtenida se observan en la Fig. 18. *P. ostreatus* presentó mayor cantidad de biomasa el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc (0.057 mg/día) seguido por el medio de cultivo conteniendo SM+500 mg/L de DEHF (0.020 mg/día). El medio de cultivo conteniendo SM y el medio SM+1000 mg/L de DEHF presentaron menor cantidad de biomasa en relación a todos los medios de cultivo (0.017 y 0.023 mg, respectivamente).

Gadd (2001) reportó en *T. viridae* alteración en la distribución de biomasa en presencia de metales tóxicos. En presencia de Cu la distribución de la biomasa se concentró en la zona de la periferia con decrecimiento total de la colonia en contraste, en presencia de Cd,

donde la biomasa se marcó en el interior de la colonia y con ligero decrecimiento.

Por otra parte, los datos obtenidos en este estudio no corresponden con lo obtenido por Saraswathy y cols. (2002) reportaron una correlación directa entre la degradación de pireno y la producción de biomasa en *Penicillium* terrestre, sugiere que al metabolizarse el pireno, se convierte en una fuente de carbono y energía para el organismo.

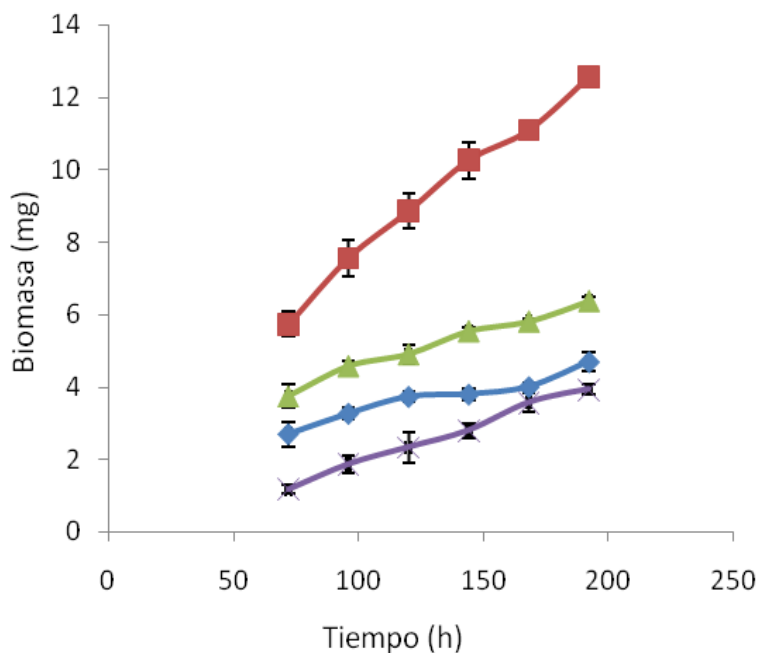


Fig. 19. Biomasa de *P. ostreatus* obtenida sobre diferentes medios de cultivo SM(\blacktriangle), SM+Gluc (\blacksquare), SM+500 mg/L DEHF (\blacktriangle), SM+1000 mg/L DEHF (\blacktriangle).

7.4. Determinación de actividad enzimática en colonias de *P. ostreatus*

En la Tabla 3 se observó mayor cantidad de lacasas en el medio de cultivo conteniendo 500 mg/L de DEHF (150.52), seguido por el medio de cultivo conteniendo 1000 mg/L de DEHF (60.95). Levin y col. (2003), al analizar la degradación de nitrobenzeno y antraceno por *Trametes trogii* reportaron una alta actividad enzimática de lacasa, mencionan que podría estar implicada en la degradación de estos compuestos xenobióticos. Pozdnyakova y

col. (2010), estudiaron la degradación de pireno por *Pleurotus ostreatus*, observaron la producción de lacasas; mencionan que es necesaria para una completa degradación del pireno. Esto sugiere y de acuerdo a los antecedentes, que el hongo *P. ostreatus* podría estar tomando como única fuente de carbono y energía el DEHF.

En cuanto a las proteasas, se observó mayor cantidad en el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc (11951.11) en relación a todos los medios de cultivo, seguido por el medio de cultivo conteniendo 500 mg/L de DEHF (11048.14). Rajarathanm y Bano (1989) reportaron que la actividad de las proteasas incrementa continuamente durante el crecimiento vegetativo y aumenta durante la fructificación. El incremento de proteasa permite que el hongo pueda degradar y desviar la degradación de productos hacia el crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos de *Schizophyllum commune*, *Physarum polycephalum* y *P. ostreatus*. Sastre-Ahuatzi y col. (2007) reportaron un incremento en la actividad de proteasas en cepas de *Pleurotus ostreatus* (ATCC 38537, ATCC 201218 y ATCC 201216) crecidas en un medio conteniendo 2-deoxiglucosa, un compuesto tóxico de estructura similar a la glucosa.

La mayor cantidad de glicógeno se presentó en el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc, relación a todos los medios de cultivo. Por otra parte, de los medios de cultivo conteniendo DEHF; se observó mayor contenido de glicógeno en el medio de cultivo conteniendo SM+1000 mg/L de DEHF. Sánchez y col. (2004) observaron en *Pleurotus pulmonarius*, específicamente en la periferia acumulación de glicógeno por métodos de tinción histológica, mencionan que es uno de los compuestos responsables del crecimiento de hifas en la zona de la periferia.

Con respecto a glucanos, el contenido de S-glucanos de todos los medio de cultivo es menor, en relación al contenido de R-glucanos. Sin embargo, en S-glucanos se observa mayor contenido en el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc (56.99) seguido por el medio de cultivo conteniendo 500 mg/L de DEHF (23.29). Por otra parte, en R-glucanos se observó mayor contenido en el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc (358.44) con respecto a los demás medio de cultivo. De los medio de cultivo conteniendo DEHF, se observó el mayor contenido en el medio conteniendo SM+1000 mg/L de DEHF (167.03) seguido por el medio conteniendo 500 mg/L de DEHF (163.88). Se ha sugerido que la capa

interna, S-glucano está representada como una capa fina compuesta de glicoproteína, muy resistente a la digestión proteolítica. La capa interna de la pared, que es insoluble en álcali, representa la parte química más compleja de la pared celular. Está compuesta de microfibrillas de quitina embebidas en una matriz formada principalmente de R-glucanos pero también contiene hexosaminas y aminoácidos. En estudios realizados por Sánchez (1998), se observó en *P. pulmonarius* que la zona madura de la colonia presentó una pared celular más gruesa, menor contenido de material citoplasmático y mayor contenido de glucanos. Estos resultados sugieren que debido a su mayor crecimiento en los medios de cultivo conteniendo SM+Gluc, y 500 mg/L de DEHF, esta cepa madura más rápidamente, presentando mayor contenido de estos compuestos.

De acuerdo a las glucanasas, se observó mayor cantidad en el medio de cultivo conteniendo SM (7.02) en comparación con el medio conteniendo SM+Gluc (5.61). Sin embargo, en los medios conteniendo 500 y 1000 mg/L de DEHF se observó similar contenido de glucanasas (21.31 y 21.53, respectivamente). Ramont y col. (2000) reportan que las glucanasas tienen una función nutricional y en particular, la movilización de β -glucanos cuando hay una fuente de carbono excesiva y un gasto de energía.

Tabla 3. Actividad enzimática en colonias de *P. ostreatus* obtenida sobre diferentes medios de cultivo

	SM	SM+Gluc	SM+500 mg/L DEHF	SM+1000 mg/L DEHF
Lacasas (U/gX)	39.111	27.654	150.518	60.952
Proteasas (U/gX)	6532.098	11951.111	11048.148	9995.238
Quitinasas (U/gX)	0.395	0	0.093	0.697
Glicógeno (mg/gX)	0.142	0.150	0.091	0.137
Glucanasas (UI/gX)	7.023	5.608	21.313	21.535
S-Glucanos (mg/gX)	23.843	56.986	23.288	17.018
R-Glucanos (mg/gX)	198.857	358.446	163.885	167.030

7.5. Correlación de la velocidad radial con respecto a la biomasa en colonias de *P. ostreatus*

En la Fig. 20, se observó una relación paralela en el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc (3.33), donde, a mayor V_r mayor cantidad de biomasa; esto se debe al contenido de glucosa siendo la única fuente de carbono y energía de fácil asimilación. En cuanto a las dos concentraciones de ftalato, se observa una relación inversa en el medio de cultivo conteniendo SM+1000 mg/L DEHF (3.35); en comparación con el medio de cultivo conteniendo SM+500 mg/L de DEHF (7.47), lo que sugiere que elevadas concentraciones de ftalato es tóxico para el hongos. Sin embargo, cabe denotar que el medio conteniendo SM+500 mg/L DEHF tiene un comportamiento similar al medio conteniendo SM+Gluc. Por otro lado, el alto contenido de proteasas, glucanasas y lacasas presentes en los medio conteniendo ftalato, indican que *P. ostreatus* está tomando como fuente de carbono y energía el DEHF para el crecimiento micelial. Gadd y col. (2001) reportaron que *T. viridae* y *Rhizopus* al estar presentes en bajas concentraciones de nutrientes disminuye el crecimiento micelial, longitud y número de ramificaciones. Ali (2007) reportó que metales tóxicos pueden inhibir el crecimiento, causar cambios morfológicos y afectar la reproducción del organismo, como en *D. carpophorus*. Camacho y col. (2010) reportaron en *Rhizopus oligosporus* una correlación entre la biomasa de las colonias (de acuerdo al contenido de glucosamina), con el diámetro de la colonia, el número de puntas de hifas, la longitud de la hifa promedio y total de la periferia zona de crecimiento; sugiriendo que estos parámetros, pueden representar el desarrollo de la colonia en cuanto a tamaño, biomasa y morfología.

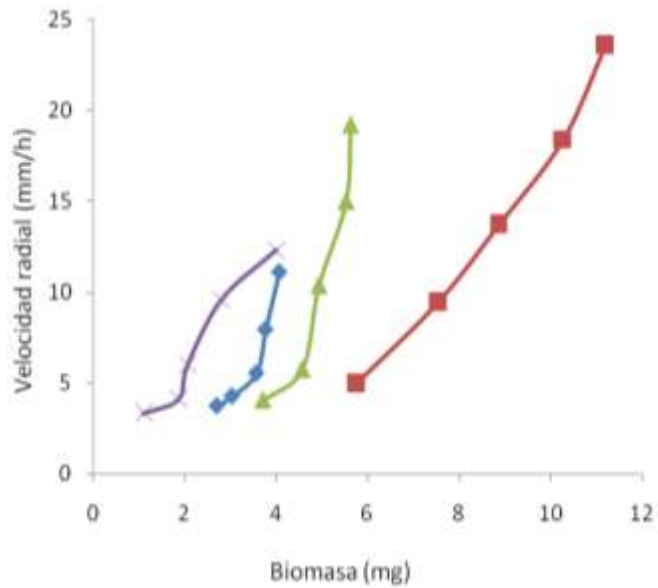


Fig. 20. Relación de la Vr con la biomasa obtenida en colonias de *P. ostreatus* SM (—●—), SM+Gluc (—■—), SM+500 mg/L DEHF (—▲—), SM+1000 mg/L DEHF (—○—).

7.6. Correlación de dimensión fractal con respecto a la velocidad de crecimiento radial en colonias de *P. ostreatus*

En la Fig. 21 se observó en el medio de cultivo conteniendo SM una disminución en la Vr con un incremento en el valor de Df del borde de la colonia (1.3) en comparación con los demás medios de cultivo. Este comportamiento se debe al estrés que presenta *P. ostreatus* por la falta de nutrientes. Sin embargo, en el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc su crecimiento tiende a ser lineal con una Df estable (1.31).

En el medio de cultivo conteniendo SM+5000 mg/L de DEHF (1.24) se observa un comportamiento similar al medio de cultivo conteniendo SM+Gluc. Lundahl y cols. (1986) reportaron que figuras regulares tendrán una DF de 1 y 2 dependiendo de la dimensión que el objeto este ocupando, en tanto, que figuras irregulares donde existen ramificaciones y huecos la Df será entre 1 y 2. Las colonias de *Pleurotus ostreatus* crecidas en medio sólido (2 D) se espera tengan valores entre 1 y 2.

Lundy y col., 2001 reportaron que *Achlya bisexualis* al estar expuesto a diferentes metales pesados (Cu, Co y Hg), se ve afectada el área micelial y su morfología. Mencionan que estos metales actúan como tóxicos y afectan el borde donde la Df incrementa. Esto da una

explicación del porque el medio de cultivo de mayor concentración de ftalato actúa como un tóxico y afecta la morfología de las colonia de *P. ostreatus*, como es en la disminución de Vr y en su borde un incremento en la Df, semejando un comportamiento al medio de cultivo conteniendo SM.

Por otro lado, se observó en la parte enzimática que la colonias de *P. ostreatus* crecidas en el medio de cultivo conteniendo SM+500 mg/L presenta mayor contenido de lacasas. Estas enzimas son de gran importancia en el crecimiento del hongo, por ser degradadoras de la ligninina, un compuesto aromático recalcitrante. Por lo anterior, esto sugiere que las enzimas lacasas, están involucradas en la degradación del DEHF y por consiguiente el hongo lo está tomando como fuente de carbono y energía.

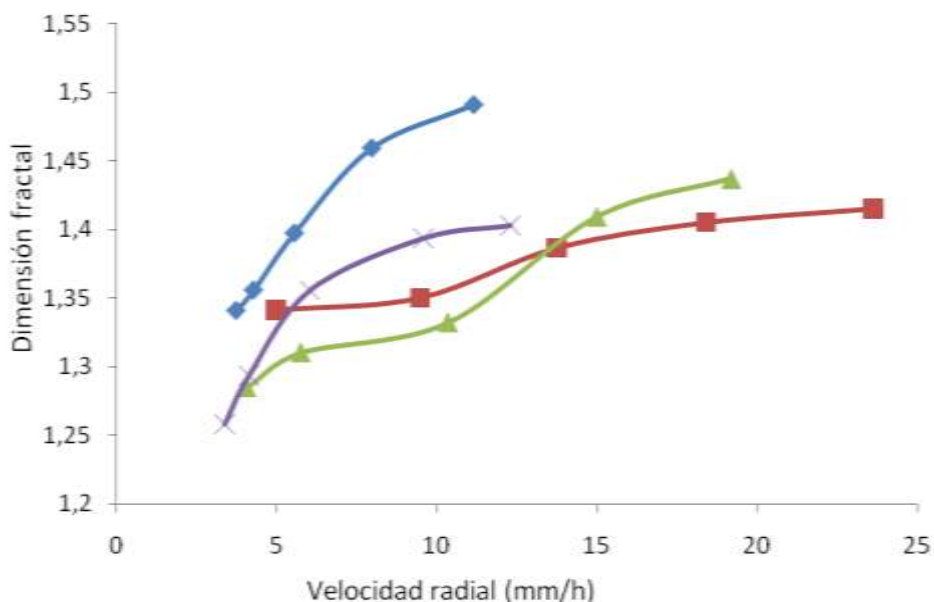


Fig. 21. Relación de la dimensión fractal con la Vr en colonias de *P. ostreatus* sobre diferentes medio de cultivo (SM(—●—), SM+Gluc (—■—), SM+500 mg/L DEHF (—▲—), SM+1000 mg/L DEHF (—×—)).

La morfología de los hongos filamentosos en presencia de compuestos xenobióticos, es difícil de evaluar, dado a la complejidad de los diferentes hábitats naturales en que se desarrollan y la escala de crecimiento a nivel micelial. La geometría fractal proporciona un método eficaz para describir patrones morfológicos de los hongos, ante compuestos tóxicos como los ftalatos.

8. CONCLUSIONES

- La Df del borde de las colonias crecidas en el medio de cultivo conteniendo SM, presentó mayor irregularidad en comparación con el medio de cultivo conteniendo SM+Gluc. Las colonias crecidas en SM+Gluc y ftalato tuvieron comportamientos similares en cuanto a la variación de la DF durante su desarrollo.
- La Vr del hongo *P. ostreatus* en 500 mg/L de DEHF fue mayor en comparación con los medios de cultivo contenido 1000 mg/L de DEHF y SM.
- La biomasa aumentó en el medio de cultivo que contenía 500 mg/L DEHF en comparación con el medio de cultivo de 1000 mg/L de DEHF.
- De los medios conteniendo DEHF, el de SM+500 de DEHF se observó una alta actividad enzimática de lacasas y glucanasas.
- Mediante la relación velocidad de crecimiento radial con respecto a biomasa se observó en el medio conteniendo SM+500 mg/L DEHF que tuvo un comportamiento similar al medio conteniendo SM+Gluc. En comparación con el medio conteniendo SM y el medio conteniendo SM+1000 mg/L DEHF, donde se observó una disminución en la Vr y biomasa.
- Mediante la relación dimensión fractal con respecto a velocidad de crecimiento radial se observó en el medio conteniendo SM una disminución en la Vr con un incremento en el valor de la DF del borde de la colonia. Sin embargo, en el medio conteniendo SM+500 mg/L DEHF tuvo tener un comportamiento similar al medio conteniendo SM+Gluc, donde la Vr aumentó y la Df se mantuvo estable.

9. REFERENCIAS

- Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150:2029–2035.
- Ali EH. 2007. Comparative study of the effect of stress by heavy metals Cd^{+2} , Pb^{+2} , and Zn^{+2} on morphological characteristics of *Saprolegnia delica* Coker and *Dictyuchus carpophorus* Zopf *Pol J Microbiol* 56:257-264.
- Anh JK, Kim YH, Min J y Lee J. 2006. Accelerated degradation of dipentyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi Cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminescent bacteria. *Current Microb* 52:340-344.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical chemists, 15th edn. Arlington, Va.
- Aon MA y Cortassa S. 1994. On fractal nature of cytoplasm. *FEBS Lett* 3344:1-4.
- Asgher M, Bhatti H, Ashraf M y Legge R. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19:771-783.
- Ashok P, Carlos R, Jose A y Rodriguez LPN. 2001. Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals applications. 1th d Ed. Asistech Publishers, INC. New Delphi pp14.
- Axtell C, Johnston CG y Bumpus JA. 2000. Bioremediation of soil contaminated with explosives at the naval weapons station yorktown. *Soil Sediment Contam* 9:537-548.
- Baldrain P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 32:78-91
- Barleta BJ y Barbosa-Cánovas GV. 1993. Fractal analysis to characterize ruggedness changes in tapped agglomerated food powders. *J Food Sci* 58:1030-1046.
- Barry D, McGee S, Ifeyinwa O, Ryan R, Williams G y Blackledge J. 2009. Relating fractal dimension to branching behaviour in filamentous microorganisms. *ISAST Trans Electron Sign Process* 4:71-76.
- Bhatnagar D, Imelda-Joseph y Raj RP. 2010. Amylase and acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus niger* from mangrove swamp. *Indian J Fish* 57(1): 45-51.
- Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, Malek NA, Reidy JA, Needham LL y Brock JW. 2000. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCIMS/ MS. *Anal Chem* 72:4127–4134
- Boddy L, Wells JM, Culshaw C y Donnelly DP. 1999. Fractal analysis in studies of mycelium in soil. *Geoderma* 88:301-328.

- Boswell GP, Jacobs H, Gadd GM, Ritz K y Davidson FA. 2003. A mathematical approach to studying fungal mycelia. *Mycologist* 17:165-171.
- Bystrova E, Bogomolova E, Panina L, Bulianitsa A y Kurochkin V. 2008. Unifying themes in complex systems IV Proceedings of the fourth international conference on complex systems: Fungal colony patterning as an example of biological self-organization. In Minai AA, Bar-Yam Y. Part II. Springer Berlin Heidelberg 389-689.
- Bezzi M y Ciliberto A. 2004. Mathematical modelling of filamentous microorganisms. *Comment Theor Biol* 8:563–58.
- Camacho-Díaz BH, Jiménez AA, Chanona-Pérez JJ, Calderón-Domínguez G, Alamilla-Beltran, Hernández -Sánchez H y Gutierrez-López GF. 2010. Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. *J Food Eng* 101(3):309-317.
- Castillo LR, Alvez TLM y Medronho RA. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol* 71:45-50.
- Chanona PJJ, Alamilla JL y Gutiérrez GF. 2001. Caos y geometría de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *Biotecnología* 5:117-125.
- Chao HR, Wang SL, Lin LY, Lee WJ y Papke O. 2007. Placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in Taiwanese mothers in relation to menstrual cycle characteristics. *Food Chem Toxicol.* 45:259-65.
- Christian V, Shrivastava R, Shukla D, Modi HA y Vyas BR. 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian J Exp Biol* 43:301-312.
- Chutmanop J, Chuichulcherm S, Chisti Y y Srinophakun P. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J Chem Technol Biotechnol* 3:1012–1018.
- Cohen R, Persky, L y Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:582-594.
- Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM y Sholtz RI. 2007. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect* 115:1406–1414.
- Cooper GS, Klebanoff MA, Promislow J, Brock JW y Longnecker MP. 2005. Polychlorinated biphenyls and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology* 16:191-200
- Crawford JW, Ritz K y Young IM. 1993. Quantification of fungal morphology, gaseous transport and microbial dynamics in soil: An integrated framework utilising fractal geometry.

Geoderma 56:157-172.

- Daffaut ELA, Posadas DA y Quiroz R 1999. Extracción de bordes de imágenes digitales a través del análisis multifractal. inrm.cip.cgiar.org/home/publicat/0403nrm.
- Dahiya N, Tewari R y Hoondal GS. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:773–782.
- De Marco JL, Lima LHC, de Sousa MV y Felix CR. 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. *World J Microbiol Biotechnol* 16:383–386.
- Denham M, Schell LM, Deane G, Gallo MV, Ravenscroft J y De Caprio AP. 2005. Relationship of lead, mercury, mirex, dichlorodiphenyldichloroethylene, hexachlorobenzene, and polychlorinated biphenyls to timing of menarche among Akwesasne Mohawk girls. *Pediatrics*. 115: 127-134.
- Dierich D, Hickey WJ y Lamar R. 1995. Degradation of 4,4'-Dichlorobiphenyl, 3,3', 4,4'-Tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microb* 61:3904-3909.
- Donnelly DP, Wilkins MF y Boddy L 1995. An integrated image analysis approach for determining biomass, radial extent and box count fractal dimension of macroscopic mycelial systems. *Binary* 7:19-28
- Dong P. 2000. Test propagation of fungal colonies: a model for tissue growth. *J Theor Biol* 98:679-701.
- Dosoretz CG, Dass SB, Reddy CA y Grethlein HE. 1990. Protease mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56:3429-3434.
- Du C y Sun D. 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends Food Sci Tech* 15: 230–249.
- Duarte S, Pascoal C y Cassio F. 2004. Effects of zinc on leaf decomposition by fungi in streams: studies in microcosms. *Microb Ecol* 93:366-374.
- Ehrmann JrJ, Vavrusov'a N, Collan Y y Kol'ar Z. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky* 146:11–14.
- Ellaiah P, Adinarayana K, Bhavani Y, Padmaja P y Srinivasula B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem* 38: 615–620.

- 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.
- Falconer K. 2003. Fractal Geometry: Mathematical Foundations and Applications. John Wiley & Sons, Ltd., pp. XXV. ISBN 0-470-84862-6.
- Falconer R, Bown J y Hart E. 2009. A new paradigm for speckNets: Inspiration from fungal colonies. www-users.cs.york.ac.uk/jtimmis/papers/CameraReady-fungus. (Consultada en Diciembre, 2010)
- Fernández J y Henao L. 2007. Evaluación de tres hongos basidiomicetos inmovilizados en *luffa Cylindrica* y fotocátalisis con TiO₂ para la remoción del Negro reactivo 5. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. pp 154.
- Fernández-Sánchez JM, Rodríguez R, Ruiz-Aguilar G y Álvarez PJJ. 2001. PCB Biodegradation in aged contaminated: Interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. J Environl Sci Health 36:1145-1162.
- Ferreira WC y Kato LA. 2003. Modelo de propagação de lesões foliares causadas por fungos. Biomatemática 8:45-53.
- Food and Drug Administration (FDA). 1999. Code Federal of Regulations. 21 CFR 181.7 Plasticizers.
- Frazar C. 2000. Bioremediation and phytytoremediation of pesticides contaminated sites. Prepair for US environmental protection agency, office of solid waste and emergency response, technology innovation office. Washington, DC. <http://www.clu-in.org>.
- Gadd GM. 2001. Fungi in bioremediation. London. Academ Press. pp 24.
- Gadd GM, Ramsay L, Crawford JW y Ritz K. 2001. Nutritional influence colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. FEMS Microbiol Lett 204(2):311-316.
- Gangepain JJ y Roques-Carmes C. 1986. Fractal approach to two-dimensional and three-dimensional surface roughness. Wear 109:119-126.
- García TAM y Torres SRG. 2003. Producción de enzimas ligninolíticas por basidiomicetes mediante la técnica de fermentación en sustrato solido. Revista Colombiana de Biotecnología 5:56-64.
- Golinski MR, Boecklen WJ y Dawe AL. 2008. Two-dimensional fractal growth properties of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*: the effects of hypovirus infection. J Basic Microb 48:426-429.

- Golovchenko AV y Polyanskaya LM. 2001. Effect of oil on the population, biomass, and viability of fungi in highmoor peats. *Microbiology* 70:96–101.
- González I, Infante D, Peteira B, Martínez B, Arias Y, González N y Miranda I. 2011. Biochemical characterization of promising isolates of *Trichoderma* spp. as biological control agents. II. Expression of glucanase activity. *Rev Protección Veg* 26:23-29.
- Goriely A y Tabor M. 2008. Mathematical modeling of hyphal growth. *Fungal Biology Reviews* 1-7.
- Grimm L, Kelly S, Krull R y Hempel D. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:375-384.
- Guler P y Ozkaya EG. 2009. Morphological development of *Morchella conica* mycelium on different agar media. *J Environ Biol* 30:601-604.
- Gusgsm A. 2009. Las imágenes de mapa bits. http://www.gusgsm.com/imagen_mapa_bits.
- Halley JM, Hartley S, Kallimanis AS, Kunin WE, Lennon JJ y Sgardelis SP. 2004. Uses abuses of fractal methodology in ecology. *Ecol Lett* 7:254-271.
- Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M y Momany M. 2005. Polarosome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* 4:225–229.
- Herrera T y Ulloa. 1998. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica-UNAM. México. pp 552.
- Herreros-Guerra MA. 2009. Estudio transnacional de los efectos del disruptor endocrino di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) sobre la función reproductiva femenina en un modelo animal ovino. Facultad de veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. pp 15-191.
- Hölker U, Höfer M y Lenz J. 2004. Biotechnology advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:175–186.
- Hwang SS, Hyung TC y Song HG. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *J Microbiol Biotechnol* 18:767-772.
- Jech L. 2000. Solid-state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Ind Crop Prod* 11:1-5.
- Ji J y Moore D. 1993. Glycogen metabolism in relation to fruit body maturation in *Coprinus cinereus*. *Mycol Resear* 97:283-289.

- Jin XC, Ong SH y Jayasooriah. 1995. A practical meth. *Pattern Recogn Lett* 16:457-464.
- Jirjis R. y Moore D. 1976. Involvement of glycogen in morphogenesis of *Coprinus cinereus*. *J Gen Micol* 95:348-352.
- Jones CL y Lonergan GT. 1997. Prediction of phenol-oxidase expression in a fungus using the fractal dimension. *Biotechnol Lett* 19:65-69.
- Jones GT y Lonergan G. 1994. Mainwaring, mycelial fragment size distribution: An analysis based on fractal geometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:242-249.
- Kalmış E, Yaşa I, Kalyoncu F, Pazarbaşı B y Koçyiğit A. 2008. Ligninolytic enzyme activities in mycelium of some wild and commercial mushrooms. *African J Biotechnol* 7:4314-4320.
- Kanmani P, Karuppasamy P, Pothiraj C y Aru V. 2009. Studies on lignocelluloses biodegradation of coir waste in solid state fermentation using *Phanerochaete chrysosporum* and *Rhizopus stolonifer*. *Afr J Biotechnol* 8:6880-6887.
- Keller J, Crownover R y Chen S. 1989. Texture description and segmentation through fractal geometry. *Comput Vision Graph* 45:150-160.
- KemI 2000. Swedish Chemical Inspectorate. Information on substance. http://www.kemi.se/kemamne_eng/ftalater:eng.htm. (Consultada en Diciembre, 2010)
- Kenkel N y Walker D. 1996. Fractals in the biological science. <http://www.umaniotoba.ca/faculties/science/botany/labs/ecology/fractals/fractal.html>. (Consultada en Diciembre, 2010).
- Kim YM y Song HG. 2009. Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation. *J Microbiol* 47:420-424.
- Klein K. 1996. Patterns in fungal development of the fungal mycelium. In Chiu SW, Moore D (eds.) *Patterns in fungal development*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 70-86.
- Koch HM, Rossbach B, Drexler H y Angerer J. 2003. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates-determination of secondary and primary phthalates monoester metabolites in urine. *Environ Res* 93:177-185.
- Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ y Alacalde M. 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. In: Méndez-Vilas A (Ed.). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 233-245.

- Latgé JP, Fontaine T, Beauvais A, Clavaud C, Mouyna I, Morelle W, Lamarre C y Kumar V. 2007. Cell wall polysaccharides of fungi and plants. The first international fungal / plant cell wall meeting. Biarritz, France. pp 11.
- Lee SM, Koo BW, Lee SS, Kim MK, Choi DH, Hong EJ, Jeung EB y Choi IG. 2004. Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enz Microb Technol* 35:417-423.
- Lecault V, Patel N y Thibault J. 2007. Morphological characterization and viability assessment of *Trichoderma reesei* by image analysis. *Biotechnol Prog* 23:734-40.
- Levin L, Viale A y Forchiassin A 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Int Biodeter Biodegr* 52:1-5.
- Liang DW, Zhang T, Fang HHP y He J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:183-198.
- Liu Ps y Lin CM. 2002. Phthalates suppress the calcium signaling of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 111:139-145.
- López JM y Jensen HJ. 2005. Generic model of morphological changes in growing colonies of fungi. *Phys Rev E* 65:1-5.
- López MA, Gomes DS, Bello-Koblitz MA, Pirovani CP, Cascardo JCM, Góes-Neto A y Micheli F. 2008. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *Mycol Res* 112:399-406.
- Lorz PM, Towae FK, Enke W, Jäckh, R y Bhargava N. 2002. Phthalic acid and derivatives. In: *Ulmans Encyclopedia of Industrial Chemistry* (release 2003), 7th Edition Online (Wiley-VCH, ed). Weinheim, Germany:Wiley-VCH.
- Lucić I y Kratky K. 2008. Fractal dimension as a tool for detection of morphological changes caused by impact of mechanical waves on mushroom mycelium. *Österreichische Mykologische Gesellschaft* 13:101-107.
- Lundahl T, Ohley W, Kays S y Siffert R. 1986. Fractional Brownian Motion: A maximum likelihood estimator and its application to imagen texture. *IEEE Trans Med Imag* MI-5 :152-161.
- Lundy SD, Payne RJ, Giles KR y Garrill A. 2001. Heavy metals have different effects on mycelial morphology of *Achlya bisexualis* as determined by fractal geometry. *FEMS Microbiol Lett* 201:259-263.
- Maier R, Pepper I y Gerba C. 2000. Microorganisms and organic pollutants. In *Environmental*

Microbiology. Academic Press, ed (Canada) pp 363-400.

Mandelbrot BB. 1982. The fractal geometry of nature. W. H. Freeman. New York. ISBN 0-7167-1186-9.

Martinell MI. 2006. Impacto de la exposición crónica al contaminante alimentario di (2-etil hexil) ftalato (DEHF) sobre aspectos metabólico nutricionales en animales de experimentación. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral. 9-30.

Matsumoto M, Hirata-Koizumo M y Ema M. 2008. Potencial adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. Regul Toxic Pharm 50:37-49.

Matsuura S. 2002. Colony patterning and collective hyphal growth of filamentous fungi. Phys Stat Mech Appl 315:125-136.

Matthews R y Niederpruem I. 1973. Differentiation in *Coprinus lagopus*. Histology and ultrastructural aspect of developing primordial. Archiu fur Microbiology 88:169-180.

Membrillo I, Sánchez C, Meneses M, Favela E y Loera O. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. Bioresour Technol 99:7842-7847.

Mery D y Pedreschi F. 2005. Segmentation of color food images using a robust algorithm. J Food Engin 66:353-360.

Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, Johnson JE, James TY, Aime MC, Hofstter V, Verduin JW, Larsson E, Baroni TJ, Thorn RG, Jacobsson S, Clémençon H y Miller M. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. Mol Phylogenet Evol 23:357-40.

Moore D. 2003. Fungal morphogenesis. Cambridge University Press, 1998. pp 469.

Moore-Landecker E. 1996. Fundamentals of fungi. 4Ed. Editorial Prentice Hall. USA. pp 574.

Murthy PS y Naidu MM. 2010. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffe by-products. WASJ 8:199-205.

Nazareth S y Marbaniang T. 2008. Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium* morphotypes. J Basic Microbiol 48:363-369.

National Toxicology Program. 2006. NTP-CERHR Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di(ethylhexyl) phthalate (DEHP). Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program.

National Toxicological Program (NTP). 2000. U.S. Department of health and human services. NTP- CERHR expert panel report on di (2-ethylhexyl) phthalate.

- Niederpruem J. 1970. Morphogenetic processes in *Schizophyllum* and *Coprinus*. Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes (Ed. M. N. Schwalb y P. G. Miles), pp 105-134. Academic Press. New York.
- Obert M, Pfeifer P y Sernetz M. 1990. Microbial growth patterns described by fractal geometry. J Bacteria 172:1180–1185.
- Okubo T, Suzuki T, Yokoyama Y, Kano K y Kano I. 2003. Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diester and monoester by MCF-7 cell proliferation assay in vitro Biol Pharm Bull 26:1219-1224.
- Olivier-Laborde. 1991. <http://setascultivadas.com/articulojunio2003.html>. (Consultada en Abril, 2010).
- Packer HL y Thomas CR. 1990. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. Biotechnol Bioeng 35:870–881.
- Palmieri G, Cennamo G y Sannia G. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. Enzyme Microb Technol 36:17-24.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P y Brenad D. 2000. Isolated under solid-substrate fermentation: Biotechnological conditions for use as a depilation agent applied potential of coffe pulp and coffe husk for bioprocesses. Biochem Eng 6:153-162.
- Papagianni M. 2006. Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *Aspergillus niger* submerged cultures. Microb Cell Fact 5:1-13.
- Pazarlýoglu NK, Sariisikb M y Telefoncu A. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. Proc Biochem 40:1673-1678.
- Pedreschi F, Mery D, Mendoza F y Aguilera JM. 2004. Classification of potato chips using pattern recognition. J Fd Sci 69:1-7.
- Peleg S, Naor J, Hartley R y Avnir D. 1984. Multiple resolution texture analysis and classification. IEEE Trans Pattern Anal Machine Intell 4:518-523.
- Pentland AP. 1984. Fractal based description of natural scenes. IEEE Trans Pattern Anal Machine Intell 6:661-674.
- Peter MG. 2005. Chitin and Chitosan in Fungi. Biopolym 5:123-147.
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R y Vazquez-Duhalt R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. Appl Environ Microb 65:3805-3809.

- Ponton J. 2008. The fungal cell wall and the mechanism of action of Anidula fungin. Rev Iberoam Micol 25:78-82
- Pozdnyakova NN, Nikiforova SV, Makarov OE, Chernyshova MP, Pankin KE y Turkovskaya OV. 2010. Influence of cultivation conditions on pyrene degradation by the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. World J Microbiol Biotechnol 26:205-211.
- Ray AK. 2005. Image processing: principles and applications. Wiley-Interscience. pp 452.
- Reddy CA. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Curr Opin Biotechnol 6:320-328.
- Remlein-Starosta D. 2003. Effect of cadmium on mycelial growth and morphology of chosen phylloplane fungi. J Plant Protection Res 43:291-296.
- Revankar MS y Lele SS. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. Process Biochem 41:581-588.
- Robles-Hernández L, Gonzalez CAF, Crawford DL y Wesley WCC. 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms. REDESMA 1:32-40
- Rodríguez E, Nuero O, Guillen F, Martínez AT y Martínez MJ. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biol Biochem 36:909-916.
- Romero MC, Reinoso EH, Urrutia IM y Kiernan AM. 2011. Fractal parameters of *Talaromyces wortmannii* as indexes of aromatic hydrocarbon pollution. IRJM 2(10):387-392.
- Romero MC, Urrutia MI, Reinoso EH y Moreno Kiernan M. 2010. Benzo[a]pyrene degradation by soil filamentous fungi. J Yeast Fungi Resear <http://www.academicjournals.org/JYFR>.
- Rudel R y Perovich L. 2008. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. Atmos Environ 43:170–178.
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnol Adv 27(2) 85-194.
- Sánchez C, Moore D y Díaz-Godínez G. 2006. Microscopic observations of the early development of *Pleurotus pulmonarius* fruit bodies. Mycologia 98(5):682-689.
- Sánchez C, Sainos E, Díaz-Godínez y Loera O. 2005. Mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* on different types of inoculum. AgroFood Industry hi-tech 16:14-16.
- Saraswathy A y Hallberg R. 2002. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. FEMS Microb Lett 210: 227-232.

- Sarkar N y Chaudhuri BB. 1992. An efficient approach to estimate fractal dimension of textural images. *Pattern Recogn* 25:1035-1041.
- Sarkar N y Chaudhuri BB. 1994. An efficient differential box-counting approach to compute fractal dimension of image. *IEEE Trans Syst Man Cybernet* 24:115-120.
- Sastre-Ahuatzi M, Téllez-Téllez M, Díaz-Godínez G, Montiel-González AM, Díaz y, Sánchez C. 2007. Mycelial growth of strains of *Pleurotus ostreatus* developed on agar and its correlation with the productivity in pilot production farm. *Braz J Microbiol* 38:568-572.
- Schmidt KR, Chand S, Gostomski PA, Boyd-Wilson KSH, Ford C y Walter M. 2005. Fungal inoculum properties and its effect on growth and enzyme activity of *trametes versicolor* in soil. *Biotechnol Prog* 21:377-385.
- Schubert M, Mourad S y Schwarze F. 2010. Radial basis function neural networks for modeling growth rates of the basidiomycetes *Physsidisporinus vitreus* and *Neolentinus lepideus*. *App Microb Biotech* 85:703-712.
- Schwarzbauer J, Heim S, Brinker S y Littke R. 2002. Occurrence and alteration of organic contaminants in seepage and leakage water from a waste deposit landfill. *Water Res* 36:2275-2287.
- Scott GM y Akhtar M. 2001. Biotechnological applications of lignin-degrading fungi (white-rot fungi). In: Steinbüchel A. (ed.) *Biopolymers Vol 1: Hofrichter M., Steinbüchel A. (eds.) Lignin, Humic Substances and Coal*. Wiley-VCH, Germany, pp. 181-207.
- Selevan SG, Rice DC, Hogan KA, Euling SY, Pfahles-Hutchens A, Bethel J. 2003. Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *N Engl J Med*. 348:1527-1536
- Sharma P, Singh L y Dilbaghi N. 2009. Biodegradation of orange II dye by *Phanerochaete chrysosporium* in simulated wastewater. *J Sci Ind Res* 68:157-161.
- Sheremata TW y Hawari J. 2000. Mineralization of RDX by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* to carbon dioxide and nitrous oxide. *Environ Sci Technol* 34:3384-3388.
- Shigekazu Y, Nopakarn R, Mamoru W y Takazhi T. 2004. A chitinase indispensable for formation of protoplast of schizophyllum commune in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by bacillus circulans KA-304. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1299-1305.
- Shimao M. 2001. Biodegradation of plastic. *Curr Opin Biotech* 12:242-247.
- Silva EM. 2003. Análise do crescimento micelial e das atividades lignocelulolíticas produzidas

durante o cultivo de *Lentinula edodes* em resíduo de *Eucalyptus saligna*. São Paulo Brasil 81.

- Silva CMMS, Melo IS y Oliveira PR. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme Microb Technol* 37:324-329
- Singh A, Sabaratnam V, Abdullah N, Annuar MSM y Ramachandran KB. 2010. Decolourisation of chemically different dyes and enzymes from spent compost of *Pleurotus sajor-caju* and their kinetics. *Afr J Biotechnol* 9:41-54.
- Slepecky RA y Starmer WT. 2009. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 101:823-832.
- Soccol CR, Luciana PS y Vandenberghe. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem Eng* 13:205-218.
- Soo-Min L, Bon-Wook K, Sung-Suk L, Myung-Kil K, Don-Ha C, Eui-Ju H, Eui-Bae J y In-Gyu C. 2004. Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme Microb Tech* 35:417-423.
- Soon-Seok H, Tae-Choi H y Hong-Gyu S. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *J Microbiol Biotechnol* 18:767-772.
- Steinberg G. 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* 6: 351-360.
- Sullivan D. 1987. Differentiable structures on fractal like sets, determined by intrinsic scaling functions on dual Cantor sets. *AMS Proc Symp Pure Math* 48:15-23.
- Suzuki K, Hirai H, Murata H y Nishida T. 2003. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res* 37:1972-1975.
- Synytsya A, Míčková K, Synytsya A, Jablonsky' I, Spěváček J, Erban V, Kovářiková E y Čopíková J. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr Polym* 76:548-556.
- Tabak HF, Hoepfner DA, Zand VD, Geuze HJ, Braakman I y Huynen MA. 2006. Formation of peroxisomes: present and past. *BBA* 1763:1647-1654.
- Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo Bazan L, Dou X, Espeso EA y Peñalva MA. 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 19:1439-1449.

- Tamagawa Y, Yamaki R, Hirai H, Kawai S y Nishida T. 2006. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65:97-101.
- Téllez-Téllez M. 2002. Determinación de las propiedades bioquímicas de hifas jóvenes y maduras de la fase vegetativa de *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. Facultad de Ciencias Biológicas-Agropecuarias. Universidad Veracruzana 15-37.
- Vacchina V, Baldrian P y Szpinar GJ. 2002. Investigation of the response of wood rotting fungi to copper stress by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with ICP MS detection. *Anal Bioanal Chem* 372:453-456.
- Vicsek T. 1989. *Fractal Growth Phenomena*, Singapore: World Scientific Publ. Co. 380.
- Valencia -del Toro G. 2002. Estudios sobre la expresión de color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. Por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis de doctorado UNAM. México, D.F.
- Villena GK y Gutiérrez CM. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: Algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev Perú Biol* 10:78-87.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 13:157-167.
- Voss R. 1986. Random fractals: characterization and measurement. In: Pynn R y Skjeltorp A, Eds., *Scaling Phenomena in Disordered Systems*. Plenum, New York.
- Walter T, Reinsch H, Ostermann K, Deutsch A y Bley T. 2005. Coordinated development of yeast colonies: An experimental analysis of the adaptation to different nutrient concentrations. *Eng Life Sci* 5:115-124.
- Watson L y Dallwitz MJ. 2008. The families of mushrooms and toadstools represented in the British Isles. <http://delta-intkey.com> (Consultada en Agosto, 2010).
- Wensing M, Uhde E y Salthammer T. 2005. Plastics additives in the indoor environment—flame retardants and plasticizers. *Sci Total Environ* 339:19-40.
- Wesenberg D, Kyriakides I y Agathos SN. 2003. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* 22:161-187.
- Windham GC, Lee D, Mitchell P, Anderson M, Petreas M y Lasley B. 2005. Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. *Epidemiology* 16:182-190.

- Wiwat C, Siwayaprahm P y Bhumiratana A. 2002. Cloning, sequencing, and expression of a chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Curr Microbiol* 44:67–172.
- Wong DWS. 2008. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnology* 157:174-209.
- Wu T, Buck GM y Mendola P. 2003. Blood lead levels and sexual maturation in U.S. girls: the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Environ Health Perspect* 111:737-741.
- Xu Q, Yin X, Wang M, Wang H, Zhang N, Shen Y, Xu S, Zhang L y Gu Z. 2010. Analysis of phthalate migration from plastic containers to packaged cooking oil and mineral water. *J Agric Food Chem* 5:11311-11317.
- Zakaria AJ y Boddy L 2002. Mycelial foraging by *Resinicium bicolor*: interactive effects of resource quantity, quality and soil composition. *Fems Microbiol Ecol* 40:135-140.
- Zheng Z, He PJ, Shao LM y Lee DJ. 2007. Phthalic acid esters in dissolved fractions of landfill leachates. *Water Res* 41:4696–4720.
- Zheng Z y Obbard JP. 2001. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb Tech* 31:3-9.
- Žnidaršič P, Komel R y Pavko A. 2000. Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. *World J Microb Biot* 7:589-591.