



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis de la degradación de bisfenol-a por un consorcio
fúngico de *Aspergillus* crecido en fermentación
sumergida.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Marcia Torres Hernández

Comité Tutoral

Dra. Miriam Ahuactzin Pérez
Dra. Dora Luz Corona Quintanilla
Dr. Julio César Morales Medina
Dra. Leticia Bucio Ortiz

Tlaxcala, Tlax.

Octubre, 2021

HOJA DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del apoyo recibido en la beca CONACYT (1007872) en la Maestría en Ciencias Biológicas registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional de Posgrado; realizada en las inmediaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Marcia Torres Hernández** realiza para la obtención del grado de **Maestra 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 **“Análisis de la degradación de bisfenol A por un consorcio fúngico de *Aspergillus* crecido en fermentación sumergida”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E TLAXCALA, TLAX.,
SEPTIEMBRE 24 DE 2021

DR. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA

DRA. MIRIAM AHUACTZIN PÉREZ

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN
RODRÍGUEZ

DRA. MARGARITA CERVANTES

M. EN C. GEORGINA PÉREZ MONTIEL

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en **Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta** de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis inscrita en su programa de estudios.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por brindarme la beca de maestría durante los dos años de desarrollo de mi proyecto.

A los miembros de **comité tutorial** que en cada momento me brindaron la atención y me compartieron de los conocimientos necesarios para desarrollar y concluir de forma pertinente mi proyecto de tesis.

Agradezco a mis codirectoras, a la doctora **Miriam Ahuactzin Pérez** y a la doctora **Dora Luz Corona Quintanilla** por la oportunidad de desarrollar un proyecto de interés ambiental y social.

De la misma manera agradezco a mis tutores a la doctora **Leticia Bucio Ortíz** de la Universidad Autónoma Metropolitana por brindarme los nuevos conocimientos que sentaron las bases para futuros proyectos de tesis que me gustaría desarrollar y al doctor **Julio Cesar Morales Medina** que ayudo de manera fundamental a que el proyecto tuviera el enfoque biotecnológico que requería.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco en primer lugar a todo el **Laboratorio de Biología experimental** de la licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitirme realizar todas mis actividades experimentales en la instalación y a todos los alumnos, colegas y docentes que me brindaron su apoyo para poder concluir en tiempo y forma todo mi proyecto.

Agradezco a la doctora **Miriam Ahuactzin Pérez** por continuar siendo mi directora y amiga durante todo este proyecto, por brindarme todo el apoyo académico y personal desde hace 6 años. Agradezco la oportunidad de continuar siendo su alumna.

Agradezco al maestro en ciencias **José Luis Torres García** por todo el apoyo brindado durante las actividades experimentales de este proyecto, por brindarme conocimientos nuevos que ayudaron de forma extraordinaria al desarrollo de todo mi proyecto.

Agradezco a mis compañeros de maestría y de laboratorio, a **Ruben, Amirani, Alanzy, Julio y Abraham** que me apoyaron en actividades experimentales siempre, así como en la formación para la presentación de mi proyecto, agradezco también de forma infinita su amistad.

De la misma forma agradezco **al resto del equipo** del Laboratorio de Biología Experimental por toda la disponibilidad siempre.

Agradezco a mis amigos y amigas, **Nancy, Josué, Briseyda y Michel** que me acompañaron durante este proceso, de manera constante o no tan constante. Agradezco su amistad y su presencia en mi vida, ustedes son parte fundamental de mí crecimiento escolar y social, espero me acompañen en este y mil logros más. Los quiero muchísimo.

Por último y no menos importante agradezco a mi mejor amiga, **Isabel** que me ha acompañado en momentos tristes, difíciles y felices, agradezco infinitamente tú presencia en mi vida, eres todo lo opuesto que necesito para complementarme al 100 por ciento. Agradezco que te hayas quedado junto a mi brindándome tu compañía en todo lo que implicó la maestría y los años que llevamos creciendo juntas, reímos y lloramos mucho, pero juntas y te agradezco mucho por eso. **Quédate siempre, eres mi persona.** Te amo con la vida.

DEDICATORIA

A *mis padres* que son mi principal motor para culminar cada una de las metas en mi vida, les dedico este logro con todo el amor del mundo, les agradezco infinitamente por todo lo que me han brindado y por la familia perfecta que tengo y amo con el alma, serán siempre mi mayor inspiración.

A la mejor compañera de vida que pude tener, *mi hermana Diana* le dedico con todo mi amor este logro porque ella me inspira a ser mejor cada día. Eres por quién deseo superarme para que te puedas sentir orgullosa, te adoro con la vida y te agradezco que seas el ser de luz que siempre está conmigo.

A *mi hermano, Antonio* por sentar las bases para que pueda con los obstáculos que la vida me ponga enfrente. Te amo mucho.

A la persona *constante en mi vida* desde hace 10 años, te dedico este logro por toda la comprensión, el amor y las experiencias que hemos pasado juntos. Agradezco tu presencia en mi vida durante tanto tiempo y deseo sea mucho tiempo más, acumulando logros y sueños realizados. Te amo.

A *tí*, gracias por guiarme al camino del amor propio aun cuando yo no sabía que estaba lejos de él. Te dedico este logro por todos los sentimientos que experimenté al conocerte, por todo lo que esto influyó en mi crecimiento académico, personal y emocional. Te agradezco infinitamente por haber cambiado mi vida y haberme enseñado que lo más importante es el amor propio y la aceptación; y que de terceras personas solo debemos aceptar todo lo bueno que merecemos y no menos, en todos los aspectos. Gracias por coincidir conmigo en esta vida.

RESUMEN

El bisfenol A (BFA) es un compuesto orgánico con dos grupos funcionales de fenol, su denominación química es 4,4'-isopropilidendifenol, este compuesto es utilizado como material de partida para la síntesis de polímeros de uso diario como policarbonatos, resinas epóxicas de envases de alimentos, dispositivos médicos, selladores dentales, poliésteres etc.

El BFA, a pesar de tener una vida media de 2.5 a 10 días, es considerado un compuesto pseudo-persistente en el ambiente. Dada su capacidad de permanecer en el ambiente o ser ubicuo, presenta una liberación constante y migración, lo que hace que sea considerado un importante contaminante ambiental. De acuerdo a su proceso de producción y a través de la lixiviación de los productos finalizados, el BFA se libera al medio y, debido, a su amplio uso su nivel de exposición hacia los humanos se ve incrementado. Una estrategia para disminuir estos efectos es mediante la aplicación de técnicas de biorremediación. La biorremediación utiliza organismos altamente adaptables y con la capacidad de crecer en un ambiente contaminado con BFA, para después eliminarlo. Los organismos capaces de biorremediar son los hongos del género *Aspergillus* y otros. Dos o más especies de hongos pueden agruparse y generar de forma sinérgica relaciones fúngicas, denominadas consorcio fúngico. Estas características son de gran importancia para los procesos de biorremediación, debido a la resistencia ambiental y diversidad metabólica que producen los consorcios fúngicos. Por ello, en esta investigación se evaluaron parámetros de la formación y crecimiento del consorcio fúngico de *Aspergillus* con y sin BFA, como medio óptimo para el crecimiento. Asimismo, se realizaron las pruebas de tolerancia de BFA, la de antagonismo entre hongos, cinética de crecimiento en fermentación sólida con cuatro tratamientos diferentes (1. Medio de cultivo con el consorcio fúngico. 2. Medio de cultivo con BFA y el consorcio fúngico. 3. Medio de cultivo con BFA. 4. Medio de cultivo) y se analizaron las siguientes variables: tasa específica de producción de CO₂ (μm), producción máxima de CO₂ ($X_{\text{máx}}$), rendimiento de CO₂ con respecto al sustrato ($Y (X/S)$), pH, consumo de glucosa y actividad máxima ($E_{\text{máx}}$) de lacasas y manganeso peroxidasa (Mn-P). Los resultados mostraron que para el crecimiento del consorcio fúngico el medio de cultivo más apto fue el segundo (medio Toyamas). La prueba de tolerancia de BFA mostró que el valor máximo tolerable para

el crecimiento del consorcio fue de arrojó que 200 ppm. Por su parte, con la prueba de antagonismo se determinó que *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P y *A. flavus* NRRL3357 son los mejores hongos para integrar parte del consorcio fúngico, debido a su capacidad de interacción entre ellos. Por otro lado, la mayor tasa específica de producción de CO₂ se obtuvo en el tratamiento 2 con un valor de 0.5969 h⁻¹. La producción máxima de CO₂ se presentó en el tratamiento 1 con un valor de 79.359 g/L. El mayor rendimiento de CO₂ con respecto al sustrato también se presentó en el tratamiento 1 con un valor de 8.3520 g_x/g_s. El pH que mostraron los tratamientos que contenían el consorcio fúngico (1 y 2) fueron de un pH inicial de 5 a un pH de 3, los 2 tratamientos restantes (3 y 4) fueron del pH inicial de 5 a un pH de 4.5. El mayor consumo de azúcares es con el tratamiento 1, en el día 8 con un valor de consumo de 6 U/L, aproximadamente. Con respecto, a la biomasa final se obtuvieron valores más reducidos en el tratamiento 1 que iban de 2.301 a 2.863 g/L *versus* el tratamiento 2 que obtuvo valores de 2.33 a 4.117g/L. Por último, la E_{máx} de la enzima lacasa presente en el tratamiento 1 fue la más alta con un valor de 168.11 U/L, así como en la actividad máxima de Mn-P que también se presentó en este tratamiento con un valor de 141.81 U/L. De acuerdo a nuestros resultados se concluye que los hongos del género *Aspergillus* son capaces de crecer de forma óptima en el medio Toyamas con una concentración máxima tolerable de 200mg/L de BFA, con base en la comparación de los tratamientos se sugiere que este género es capaz usar el BFA como fuente secundaria de carbono debido al posible co-metabolismo de la glucosa con el BFA, se puede sugerir una degradación con la presencia y el comportamiento de las enzimas presentes en la cinética de crecimiento.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 BISFENOLES	10
1.2 BISFENOL A.....	11
1.2.1 DISRUPCIÓN ENDOCRINA DE BFA	13
1.2.2 TOXICIDAD DEL BFA	16
1.2.3 BFA EN EL AMBIENTE.....	17
1.3 BIORREMEDIACIÓN CON HONGOS.....	19
1.3.1 ENZIMAS EN LA BIORREMEDIACIÓN.....	21
1.3.2 LACASAS.....	22
1.3.3 MANGANESO PEROXIDASAS	24
1.4 HONGOS ASCOMICETOS	26
1.5 GENERO ASPERGILLUS	27
1.5.2 CONSORCIOS.....	30
1.5.2 CONSORCIOS FÚNGICOS	33
1.6 FERMENTACIÓN SUMERGIDA	34
2. ANTECEDENTES.....	35
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS.....	38
5. OBJETIVOS	39
5.1 OBJETIVO GENERAL	39
Analizar la degradación de BFA empleando un consorcio fúngico de Aspergillus en fermentación sumergida.....	39
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	39
6. METODOLOGÍA	39
6.1 Etapa 1: Formación del consorcio fúngico y caracterización de las condiciones de crecimiento. 39	
6.1.2 Prueba de medios.....	39
6.1.3 Prueba de tolerancia	40
6.1.4 Prueba de antagonismo.....	40
6.2 Etapa 2: Crecimiento del CF en fermentación líquida, análisis de intermediarios de degradación del BFA.....	42
6.2.1 Fermentación líquida/sumergida.....	42
6.2.2 Producción de dióxido de carbono.....	42

6.2.3	Perfiles de pH.....	43
6.2.4	Determinación del consumo de glucosa.....	43
6.2.5	Actividad y parámetros cinéticos de producción de lacasas.....	43
6.2.6	Actividad y parámetros cinéticos de producción de Mn-P.....	43
6.2.7	Determinación de biomasa final	44
7.	RESULTADOS.....	44
7.1	Prueba de medios	44
7.1.1	Velocidades de crecimiento sin BFA.....	44
7.1.2	Velocidades de crecimiento con BFA.....	45
7.1.3	Porcentajes de inhibición.....	46
7.2	Prueba de tolerancia	47
7.2.1	Velocidad de crecimiento	47
7.2.2	Porcentaje de inhibición	48
7.3	Prueba de antagonismo.....	51
7.3.1	Prueba de antagonismo sin BFA.....	52
7.3.3	Prueba de antagonismo con BFA.....	54
7.4	Cinética de crecimiento del consorcio fúngico	56
7.4.1	Producción instantánea de dióxido de carbono	56
7.4.2	Producción de CO ₂ acumulado	59
7.4.3	pH de la fermentación sumergida	60
7.4.4	Consumo de azúcares	61
7.4.5	Producción de lacasas	62
7.4.6	Producción de Mn-P	63
7.4.7	Producción de biomasa.....	65
8.	DISCUSIÓN	66
9.	CONCLUSIONES	75
10.	PERSPECTIVAS	76
11.	REFERENCIAS	77
2.	ANEXOS	90
	ÍNDICE DE FIGURAS	90
	ÍNDICE DE TABLAS	92

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BISFENOLES

En la industria existen compuestos utilizados como aditivos para la producción de numerosos productos de plásticos industriales, estos compuestos son los difenilmetanos, mejor conocidos como bisfenoles (Caballero-Casero y Rubio 2017). Estos compuestos orgánicos están formados por dos anillos de benceno separados por un átomo de carbono central, generalmente con un sustituyente 4-OH en ambos anillos del benceno (Hercog y cols. 2019). También, tienen la capacidad de migrar mediante proceso de degradación polimérica desde los productos que forman parte del suelo, agua y humanos. Otra característica de los bisfenoles, como sus derivados, es que son androgénicos y estrogénicos, que, a través de su ingesta, están expuestos los humanos (Caballero-Casero y Rubio 2017).

Diversos estudios consideran a los bisfenoles disruptores endocrinos. Es decir, compuestos químicos heterogéneos que tienen como característica de interferir y alterar la función del sistema endocrino, por ejemplo, las hormonas sexuales, tiroideas, pancreáticas (como la insulina), entre otras. Estos se pueden encontrar en paquetes de alimentos, latas, residuos de insecticidas y más (Dallio y cols. 2018). Muchos de estos bisfenoles son utilizados para la elaboración de plásticos, existen dos tipos, los termoestables que son polímeros que solidifican de forma irreversible cuando se calienta, son usados para la resistencia y durabilidad, así como los termoplásticos son polímeros en los que las moléculas se mantienen unidas por enlaces débiles, creando plásticos que se ablandan cuando se ven expuestos a temperaturas altas y vuelven a su forma en temperatura ambiente (Halden 2010). Estos dos tipos, los termoestables y los termoplásticos, según sus características, son utilizados en techos, fabricación de vidrio, luces de techo, señales de tráfico, paneles protectores, en medicina y en protección de salud, en cascos y gafas, esta es una razón para aumentar la producción del mercado. Sin embargo, la alta demanda de estos productos aumenta la contaminación del ambiente y la exposición en los humanos. Se estima que 30 a 40% del plástico que se produce en el mundo es para envases que cumplen diferentes propósitos, uno en particular, elevar directamente un 12% anual la tasa de basura plástica (Clukey y cols. 2018).

1.2 BISFENOL A

El compuesto orgánico 4,4'-isopropilidendifenol comúnmente conocido como bisfenol A (BFA) está conformado por dos anillos de fenol conectados por un puente de metilo, con dos grupos funcionales de metilo unidos al puente (Figura 1) (Murata 2017). Este compuesto tiene un peso molecular de 228.29 g/cm³, es una sustancia blanca, cristalina y sólida, incoloro orgánico, con un punto de fusión de 156 °C y un punto de ebullición de 220 °C, siendo uno de los productos químicos con mayor volumen de disponibilidad actualmente (Tarantino y cols, 2013).

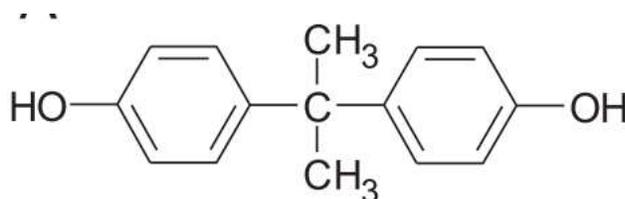


Figura 1. Composición química del BFA

El BFA es lipofílico y detectable en todo el mundo a niveles nanomolares en suero humano, que alteran el funcionamiento del sistema endócrino de los mamíferos, entre ellos el humano (Vandenberg y cols. 2007, Tarantino y cols. 2013). Es utilizado como material de partida para la síntesis de polímeros que incluyen policarbonatos, resinas epóxicas de envases de alimentos, dispositivos médicos, selladores dentales, poliésteres y como aditivo para la eliminación del exceso de ácido clorhídrico en la producción de organosoles de PVC (Escalona y cols. 2014, Aghajanjpour-Mir y cols. 2016, Zhang y cols. 2011).

El BFA tiene una vida media de 2.5 a 10 días en el ambiente; debido a ello se considera un químico pseudo-persistente en el ambiente y, dada, su ubicuidad de constante liberación y migración es considerado un importante contaminante ambiental (US EPA, 2010). Las principales fuentes ambientales donde se libera el BFA se clasifican como fuentes de preconsumo y postconsumo (Corrales y cols. 2015). El BFA puede liberarse al ambiente durante su proceso de producción y mediante la lixiviación de productos finalizados, debido al amplio uso de este, el potencial con el que se expone a los humanos es alto (Ahmadkhaniha y cols. 2014).

El BFA es un compuesto que bajo ciertas condiciones puede fotodegradarse; sin embargo, su hidrólisis en el ambiente es mínima, ya que no contiene grupos funcionales que sean susceptibles a este proceso. Por la falta de estos grupos funcionales cualquier residuo de BFA sin reaccionar al encontrarse presente en los productos de plásticos de policarbonato o resinas epoxi puede filtrarse en los alimentos o ambiente. De acuerdo a los datos en el Inventario de Liberación de Tóxicos de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, para el 2007 la liberación total de BFA fue de 2,496,197 kg, de los cuales, 271,138 kg se liberaron al aire y 33,013 kg in situ en suelo (US EPA 2010). México se ubica como el segundo país con mayor concentración de BFA en sus aguas residuales y sus concentraciones oscilan entre 148 a 9340 ng/L (Lesser y cols. 2018). La presencia ambiental del BFA desencadena una exposición a una gran variedad de organismos, entre los que se encuentran los humanos, además de que por ser considerado un compuesto de baja o moderada hidrofobicidad puede llegar a bioacumularse en ecosistemas perturbados y tiene efectos importantes, a través de diferentes vías de los diversos organismos que forman las redes tróficas (US EPA 2010; Flint y cols. 2012). El proceso de incremento del BFA en las redes tróficas comienza con la bioconcentración, que se define como la capacidad del BFA para concentrarse (aumentar progresivamente su concentración) en células o tejidos (Mackay y cols. 2018)

En el caso de los seres humanos, la exposición al BFA es por vía olfativa, absorción epidérmica e ingesta de alimentos industrializados, con empaques expuestos al BFA (Knez y cols. 2014). Debido, a que el proceso de polimerización de BFA deja monómeros sin unir, las moléculas pueden liberarse de los envases y una fracción considerable de masa entra en contacto con los alimentos y bebidas. Mientras, el proceso de lixiviación se acelera por el lavado de continuo de recipientes o el almacenamiento de elementos ácidos o básicos en ellos que pueden descomponer el polímero, esto puede referirse a botellas de agua reutilizables, biberones y revestimientos en latas de alimentos (Halden y cols. 2010). Después de la ingesta, el BFA se metaboliza a través de la glucuronidación en la pared intestinal y el hígado; su eliminación es por el filtrado glomerular, lo que hace que el compuesto tenga una vida media en el cuerpo de aproximadamente 4-6 horas (Nicolucci y cols. 2017). El mecanismo de acción del BFA varía, según la dosis, el tejido y la etapa de exposición (García y cols. 2015).

En los adultos la ingesta promedio de BFA al día es de 0.4 a 1.4µg BFA/kg de peso corporal (Vandenberg y cols. 2010) y los niveles de BFA no conjugado en sangre y tejidos humanos se encuentran en el rango de 0.1 a 10 µg/L (Halden y cols. 2010). Cuando el BFA ingresa al organismo por vía oral; éste se metaboliza en el hígado y con mayor velocidad se convierte en un metabolito muy soluble, denominado BPA-glucuronido (BPA-GLU). Una cantidad más pequeña de BFA, reacciona con sulfato dando lugar a BFA-Sulfato (Geens y cols. 2012). La conjugación del BFA se considera un proceso de desintoxicación, ya que este, se elimina de manera eficiente por la orina. Tras la exposición oral, el BFA libre es muy poco biodisponible, lo que demuestra la eficacia del primer paso hepático del metabolismo del BFA (EFSA, 2008). El BFA conjugado no presenta actividad estrogénica, por lo que cuando el BFA es metabolizado, sólo una pequeña cantidad de BFA libre puede unirse a los receptores estrogénicos produciendo las disrupciones hormonales y, por consiguiente, efectos adversos (García y cols. 2015)

Este compuesto químico industrial se sintetizó por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr Pavlov Dianin como un estrógeno sintético y describió que tenía la eficacia de la estrona, al estimular el aparato reproductor femenino en ratas en la década de 1930. En la década de 1950 se conoció su uso en la fabricación de resinas epoxi y plásticos de policarbonato. Se ha demostrado también que el BFA es teratogénico y estrogénico (Di Donato y cols. 2017; Salame-Méndez y cols. 2010). A dosis muy bajas de BFA en los humanos puede inducir proliferación de células de cancerígenas de próstata, enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y anomalías de enzimas hepáticas. Estas alteraciones fisiológicas fueron encontradas en una muestra representativa de la población adulta de EE. UU (Mohapatra y cols. 2010). Estudios actuales demuestran que el BFA tiene un nivel de actividad estrogénica, incluso a dosis bajas de 0.23 pg/mL en cultivo, lo que estaría relacionado con el aumento en la proliferación de células cancerosas y toxicidad (Escalona y cols. 2014).

1.2.1 DISRUPCIÓN ENDOCRINA DE BFA

Existen hormonas como los estrógenos, andrógenos, glucocorticoides, insulina, tiroideas, entre otras, que controlan o influyen en el funcionamiento de tejidos y órganos involucrados en el

metabolismo y el peso corporal (Nahar y cols 2012). Una cantidad considerable de contaminantes ambientales llamados “químicos disruptores endocrinos” tienen la capacidad de interferir o imitar las funciones de las hormonas endógenas (Lama y cols. 2019). Existen distintos componentes fenólicos que son compuestos de alteración endocrina (Yamamoto y cols. 2001). Este tipo de disruptores producen un efecto de manera diversa, debido a que su estructura química, es similar a la de una hormona endógena, mimetiza su función y se une al receptor en las células blanco. Al unirse a él puede llevar a cabo su función biológica, como cambiar o bloquear las funciones hormonales, causando efectos adversos en el desarrollo, reproducción, neurología, daño cardiovascular, metabólico e inmune en los humanos (Lama y cols. 2019). Por lo tanto, la hormona no realiza un efecto benéfico ya que su receptor está ocupado por el “xenobiótico intruso”. Estos disruptores, también, pueden inhibir la acción enzimática involucrada en el proceso de inactivar a las hormonas e impedir su eliminación por el sistema excretor (Salame-Méndez y cols. 2010). También, interfieren con la inactivación y eliminación de la hormona endógena al unirse débilmente a varios receptores de esteroides incluyendo los estrogénicos alfa y beta ($ER \alpha$ y β) y los de la hormona tiroidea (Nahar y cols 2012).

El BFA es considerado como un producto químico con potencial estrogénico y efectos significativos a dosis bajas en animales experimentales, incluidos los efectos adversos en los niveles sanguíneos dentro y por debajo de los niveles promedio en sangre humana (Mohapatra y cols. 2010). Esto es, posiblemente, porque su estructura química es muy similar a la de los estrógenos sintéticos, dietilestilbestrol y hexestrol; así como al componente bisfenólico del tamoxifeno (Hanioka y cols. 1998). Investigaciones se han dirigido a identificar las actividades disruptivas del BFA, se han enfocado en órganos reproductores sensibles al estrógeno, ya que el BFA puede perturbar una diversidad de vías biológicas como la diferenciación, la proliferación y el desarrollo de tejidos (Kim y cols. 2019).

El potencial como xenobiótico que tiene el BFA sobre diversas hormonas es alto, como en la hormona tiroidea, que recientemente se informó que es capaz de unirse al receptor de esta hormona y actuar como un receptor *in vitro*, la insuficiencia transitoria de esta hormona puede afectar el resultado cognitivo en humanos (Zoeller y cols. 2005). Lo que estos hallazgos sugieren es que el BFA actúa como antagonista en la hormona tiroidea en el receptor tiroideo, lo que media el efecto de retroalimentación negativa de la hormona tiroidea en la glándula pituitaria

(Zoeller y cols. 2005). Por otro lado, la exposición oral prolongada al BFA en ratones en crecimiento indujo a la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina y se sugiere que la resistencia a la insulina esquelética inducida por el BPA podría estar relacionada con los cambios en las adipocitocinas séricas (Moon y cols. 2015).

El BFA también puede filtrarse al suelo y, a través, de escurrimiento se acarrea a los mantos freáticos y contaminarlos. Entonces, los humanos al ingerir agua contaminada con BFA tienen mayor acumulación del compuesto y la acción estrogénica puede causar efectos perjudiciales en el sistema endocrino de los organismos (Vom-Saal y Welshons, 2006). Debido a que producen alteraciones endocrinas, su potencial oxidativo y mutagénico, a través de procesos de hipometilación, son capaces de provocar efectos tóxicos multidireccionales en animales y posiblemente en humanos. En diversos estudios se ha demostrado que el BFA interrumpe la función de varias hormonas, como la hormona sexual, la leptina, la insulina y la tiroxina. Además, de los efectos hepatotóxicos, inmunotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, así como los riesgos potenciales de BFA incluían efectos de reproducción y desarrollo, efectos neuroquímicos y de comportamiento (Meeker y cols. 2010, Doherty y cols. 2010, Clayton y cols. 2011, Zeinab y cols. 2012, Vom y cols. 2005).

Diversos estudios indican que el BFA puede provocar efectos adversos para la salud, como cáncer de próstata, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, desequilibrio hormonal y alteraciones de las enzimas hepáticas, además de efectos en la reproducción y el desarrollo, efectos neuroquímicos y conductuales (Wetherill y cols. 2002, Vom Saal y Hughes, 2005, Signorile y cols. 2010, Dallio y cols. 2018) Existen dos estudios epidemiológicos que potencialmente relacionaron los niveles sanguíneos de BFA con enfermedades ováricas y abortos espontáneos (Takeuchi y cols. 2004, Sugiura Ogasawara y cols. 2005). También existe evidencia epidemiológica de que el aumento de BFA en el aparato urinario está asociado tanto con la obesidad, así como con la resistencia a la insulina. Incluso, el BFA se puede proponer como un nuevo bioexógeno ambiental (Wang y cols. 2012b, Li y cols. 2013).

EL BFA presente en orina sugiere que el metabolismo de los esfingolípidos, la esteroidogénesis y el metabolismo de aminoácidos está alterado; además de influir en procesos metabólicos y de señalización en el metabolismo hepático, patologías relacionadas con carcinogenicidad por la exposición a dosis bajas de BFA (Kim y cols. 2019).

1.2.2 TOXICIDAD DEL BFA

El BFA está presente en el ambiente, la vía de contaminación más común es por la exposición de los alimentos con el compuesto. Otra vía importante es la exposición al BFA mediante la transferencia dérmica (Björnsdotter y cols. 2017, Eckardt y Simat 2017). Muchos estudios indican que el BFA está involucrado en aberraciones cromosómicas, ya que se han reportado incidencias como la aneuploidia a través de la interrupción del proceso meiótico y también aberraciones como la rotura de ADN y el deterioro de la doble cadena (Aghajanpour y cols. 2016). Aunque la dosis letal se ha extrapolado a partir de estudios en ratones a humanos y estas dosis son muy altas (6000 mg/kg/pc), se han descrito casos en los que el BFA aumenta la expresión del gen HOXC6 a concentraciones muy bajas (0.1-1000 nM) en distintas líneas celulares: MCF7 (adenocarcinoma mamario sensible a RE) y T47D (carcinoma ductal mamario sensible a RE). La sobreexpresión del gen HOXC6 se utiliza como indicador de distintos tipos de cáncer de mama, ya que se ha visto que el aumento de los niveles de expresión, inducen el crecimiento de factores tumorales y facilita la formación de colonias, indicando un riesgo potencial en el crecimiento de un tumor en las glándulas mamarias (Fodelianakis y cols. 2015).

El BFA se ha involucrado en trastornos reproductivos masculinos (cáncer de testículos, criptorquidia, hipospadias, y bajos conteos de esperma) lo que podría originarse por una mayor exposición fetal del varón en desarrollo a los estrógenos ambientales (Korkmaz y cols. 2010)

Para que el BFA pueda ser considerado un genotóxico se requieren exclusiones de efectos genotóxicos secundarios que pueden ocurrir después de sus efectos citotóxicos, como la apoptosis y la necrosis (Aghajanpour y cols. 2016). En una investigación con dosis de 125mg/Kg de BFA en ratas se reportó la disminución de ratas preñadas, reducción de ratas con función espermática y la reducción significativa de fetos vivos, ya que se observó una toxicidad material (histocitosis, macrófagos pigmentados intraalveolares y peritonitis) (Morrissey y cols. 1987). Datos *in vivo* han mostrado la capacidad del BFA a bioacumularse especialmente en el tejido adiposo y en el hígado, a través del aumento del estrés oxidativo, induciendo inflamación en las células del hígado, lo que resulta en el desarrollo y en la progresión de enfermedades hepáticas como el hígado graso no alcohólico (Lama y cols. 2019). Los estudios *in vitro*, por su lado, demostraron un aumento a la resistencia de insulina y la inflamación en células, confirmando

un efecto directo en la homeostasis hepática y del tejido adiposo, estos estudios *in vitro* se realizaron la línea celular HepG2 (Lama y cols. 2019).

El BFA, también, tiene puede absorberse por la piel y causa daño hepático, renal y afectaciones en otros órganos humanos, además, de la disminución de la actividad de las isoformas específicas del citocromo P450, testosterona y 6-b-hidroxilasa, participando también en la formación de aductos de ADN junto con peroxidasas y peróxido de hidrogeno, también sea detectado la formación de células gigantes multinucleadas en hepatocitos de rata *in vitro* (Bindhumol y cols. 2003).

1.2.3 BFA EN EL AMBIENTE

En el ambiente existe una diversidad de componentes orgánicos como el BFA que se origina por la condensación del fenol y la acetona en condiciones de pH bajo y alta temperatura (Golshan y cols. 2019). Cuando un ecosistema se ve afectado por todo tipo de estrés ambiental, el método del cociente de riesgo puede utilizarse para evaluar el impacto en el ecosistema, el riesgo ecológico causado por los bisfenoles se calculó mediante el cociente de riesgo propuesto por la Unión Europea para clasificar el nivel de riesgo basado en múltiples datos de toxicidad, el riesgo ecológico en el ambiente del BFA está por encima de otros bisfenoles con un valor de 70%. Este producto químico es resistente a algunos procesos de biodegradación y permanece en el ambiente durante periodos específicos de tiempo, causando perjuicios crónicos y agudos que amenazan y cambian los componentes bióticos de los ecosistemas (Liu y cols. 2021; Elekwuachi y cols. 2014). A pesar de los continuos debates medioambientales sobre los peligros de los materiales plásticos, su producción aumenta en todo el mundo a un ritmo del 5% anual. Aunado a esto, el desarrollo de técnicas de reciclaje de materiales poliméricos durante los últimos años ha contribuido a este incremento (Graziani y cols. 2019)

Durante la producción, el uso, el envejecimiento y la eliminación de contaminantes en los últimos 10 años, más de un millón de libras de BFA fueron liberadas al ambiente para entrar a las diferentes matrices ambientales (Trivedi y Chhaya 2021). Este contaminante está presente por medio de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales con concentraciones que oscilan entre 0.23 y 149 $\mu\text{g/L}^3$, los residuos plásticos en los lixiviados de los vertederos

peligrosos que oscilan entre 1.3-17.200 ng/mL, las unidades de procesamiento de lodos activados, los sedimentos de los ríos o el agua del mar, el BFA se encuentra en la litosfera, la biosfera, la hidrosfera y la atmósfera todo esto hace que sea omnipresente en el ambiente (Golshan y cols. 2019). Se sabe que este xenobiótico en los residuos plásticos del agua es moderadamente soluble con datos de 120-300 mg/L a un pH de 7, su vida media en aguas medias y aguas receptoras es de 2.5-4 días, el comportamiento del compuesto en el agua natural muestra una fuerte especificidad. Algunos estudios han cuantificado sus concentraciones y describen que van de 5 a 284 ng/g⁻¹ de BFA en fragmentos de plástico en todo el mar. Debido a su presencia en la hidrosfera, también, los animales acuáticos se ven afectados por este contaminante, como es el caso de la rana de manchas negras que presenta una inhibición del crecimiento del embrión con una dosis de exposición de 4.5-4.8 mg/L, después de la exposición las deformidades se manifiestan en la curvatura de la cola y la espalda, la cabeza, la cara y el edema abdominal (Husain y Qayyum. 2013; Santana y cols. 2019; Liu y cols. 2021).

Investigaciones describen que el BFA puede ser adsorbido también al sedimento, que tiene baja volatilidad. Se sabe que aproximadamente la mitad de la cantidad liberadas al ambiente se asocian con el suelo o con sedimentos por la baja solubilidad del compuesto, la materia orgánica disuelta en estas matrices puede afectar de forma significativa el comportamiento químico ambiental del contaminante a través de la unión covalente, redox, etc (Husain y Qayyum. 2013; Yu y cols. 2019; Deng y cols. 2021).

El suelo es otra matriz ambiental en donde encontramos concentraciones de BFA, este es un ecosistema dinámico y complejo, reconocido como uno de los mejores receptores de este tipo de contaminantes orgánicos (Park y cols. 2018). En particular, los suelos pueden estar contaminados con plastificantes por las precipitaciones, el riego con agua, las aplicaciones de fertilizantes y los biosólidos (Turco y cols. 2020). Las interacciones de los bisfenoles con los componentes del entorno edafológico son muy complejas, los cambios que estos producen en la actividad biológica son debidos a los metabolitos fenólicos secundarios que logran modificar la estabilidad química de las células (Zaborowska y cols. 2018).

Algunos estudios muestran que los posibles mecanismos de la vía de degradación del BFA son la hidroxilación, la escisión del anillo, la oxidación y las reacciones de apertura del anillo (Abdul y cols. 2021). La implementación de microorganismos en conjunto que provengan del

ambiente para biorremediación, muestra que se puede lograr la degradación completa del BFA. La amplia gama de vías catabólicas de un consorcio puede obtener una degradación eficiente del BFA y sus intermedios de biodegradación en metabolitos con una actividad estrogénica mucho menor (Eio y cols. 2019). Sin embargo, el BFA es recalcitrante y poco biodegradable, por lo que es muy interesante encontrar un método eficaz para eliminarlo del agua y de las distintas matrices ambientales en donde se encuentra en altas y bajas concentraciones. La biodegradación es una estrategia para la descomposición de contaminantes de forma natural por la acción de agentes biológicos. Para biodegradar el BFA se han utilizado diferentes cepas microbianas y el BFA co-metabolizado favorecería su biodegradación.

1.3 BIORREMEDIACIÓN CON HONGOS

La contaminación por plásticos es un problema mundial tanto social, como ambiental que con el paso de los años aumenta de forma exponencial, una de las soluciones es la biorremediación, los microorganismos juegan un papel importante en el destino de los contaminantes en el ambiente, como la bioadsorción y la biodegradación, en donde los microorganismos son considerados como biosorbentes (Chen y cols. 2010). La degradación de contaminantes mediante varias vías de actividades metabólicas de diversidad de microorganismos es la técnica llamada biorremediación (Aydin y cols. 2016). La capacidad metabólica de poblaciones microbianas frente a los contaminantes presentes en un suelo es el fundamento sobre el que se sustenta esta tecnología (Alexander 1999).

Los microorganismos se utilizan para catalizar la oxidación-reducción y romper los enlaces químicos en los polímeros plásticos, el deterioro biológico de los contaminantes depende de factores como área superficial, grupos funcionales, peso molecular, hidrofílico e hidrofobicidad, temperatura de fusión, estructura química, cristalinidad, superficie, etcétera (Okada 2002). Los poliésteres tienen menos tendencia a degradarse porque están menos asimilados que los que no tienen cadenas laterales. El peso molecular del polímero también afecta al proceso de degradabilidad, a mayor peso molecular de los polímeros plásticos se reduce el potencial de degradación, al disminuir su solubilidad y la tasa de degradación. Además, la reducción de la solubilidad hace que los polímeros plásticos sean menos vulnerables al ataque

microbiano porque son asimilados por los microorganismos a través de la membrana celular (Siracusa y cols. 2008). La cristalinidad es otro factor crucial que afecta a la biodegradabilidad; los polímeros que contienen dominios amorfos son más vulnerables al ataque enzimático microbiano. La naturaleza cristalina de los polímeros plásticos los hace menos accesibles para la acción enzimática microbiana. Por lo tanto, la tasa de degradación de los plásticos disminuye con el aumento de la cristalinidad del polímero. Por otro lado, la naturaleza hidrofóbica de los polímeros plásticos restringe la acción microbiana al inhibir la absorción de agua que puede ser superada por la formación de biopelículas (Jaiswal y cols. 2019). Si la actividad metabólica de los microorganismos frente a los contaminantes es efectiva no se produce contaminación secundaria; lo que hace a la biorremediación una estrategia rentable para disminuir la contaminación del ambiente (Aydin y cols. 2016). Para que esta solución pueda ser aprovechada tiene que existir una modificación del polímero transformándose en compuestos más oxidados de bajo peso molecular para facilitar la biorremediación y así los microorganismos puedan asimilar el carbono contenido en los polímeros (Manzur y cols. 2004). Los microorganismos son perfectamente adecuados para la reducción de contaminantes plásticos porque tienen enzimas que les permiten utilizar el plástico como sustrato ya que pueden catalizar la reducción de la oxidación para poder romper enlaces químicos en los polímeros (Tokiwa y cols. 2009). La biodegradación del polímero plástico por las enzimas microbianas es una tarea típicamente difícil debido a la falta de grupo funcional hidrolizable en su columna C-C. Por lo tanto, inicialmente, el proceso de descomposición de los plásticos implica una acción sinérgica de los factores bióticos y abióticos que han sido responsables de la reducción del peso molecular. La exposición a la radiación UV hace que el grupo carbonilo de los polímeros plásticos sea más vulnerable al ataque enzimático microbiano (Jaiswal y cols. 2019).

Se ha descrito que los hongos filamentosos tienen la capacidad metabólica de degradar hidrocarburos, los micelios fúngicos mejoran el área de superficie donde se lleva a cabo de biodegradación (Aydin y cols. 2016). Debido a la diversidad metabólica de cada especie fúngica, se generan diferentes matrices de metabolitos durante el proceso de degradación, los principales son azúcares y dióxido de carbono, también existen metabolitos secundarios que pueden afectar el crecimiento y velocidad del microorganismo durante la degradación (Karpe y cols. 2015). La diversidad de microorganismos que se aísla actualmente en todo el mundo ha aumentado, así

como la gama de sustratos y productos que se pueden producir han aumentado de forma constante, por lo tanto, el gran potencial de los microorganismos es difícil que se alcance en un futuro próximo (Ferreira y cols. 2016).

1.3.1 ENZIMAS EN LA BIORREMEDIACIÓN

El mecanismo que permite que los hongos aborden el problema de la degradación está relacionado con las enzimas que producen, por ejemplo, la oxigenasa, esta disminuye el oxígeno elemental para activar los hongos y que crezcan sobre el sustrato contaminado (Aydin y cols. 20016). Otras enzimas microbianas también participan en la degradación de polímeros plásticos como la oxidorreductasa, lacasa, manganeso peroxidasa (Mn-P), estas los descomponen en una cadena pequeña de monómeros, y oligómeros que atraviesan de forma rápida la membrana celular y se pueden utilizar como fuente de carbono y energía (Raziyafathimay cols. 2016). Se considera que las peroxidases y lacasas fúngicas extracelulares tienen un mayor potencial que las enzimas vegetales para aplicaciones medioambientales viables, debido a la relativa facilidad de separación y purificación de las enzimas (Ikehata y cols. 2004). La biorremediación de los contaminantes orgánicos persistentes mediante el uso de enzimas se considera respetuosa, rentable, innovadora y prometedora con el ambiente (Tahiri y cols. 2013).

El problema al que se enfrenta la biorremediación del BFA es su naturaleza hidrofóbica que lo hace insoluble en agua, pero es soluble en disolvente orgánico, teniendo en cuenta la mayor solubilidad del BFA en el disolvente orgánico para la catálisis no acuosa, se pueden emplear enzimas como la lacasa y la Mn-P (Trivedi y Chhaya 2021). Investigaciones demuestran la capacidad de estas enzimas para degradar y polimerizar el BFA tanto *in vivo* como *in vitro* (Limura y cols. 2007).

Las enzimas denominadas “lacasas” son biocatalizadores eficientes ya que, no necesitan la adición de H_2O_2 y otros cofactores como alcohol veratílico o Mn^{+2} . Éstas utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Arca-Ramos y cols. 2015), son enzimas extracelulares que contienen múltiples tipos de cobre y que consisten en glicoproteínas monoméricas, diméricas y tetraméricas caracterizadas por plantas, bacterias y hongos (Shraddha y cols. 2011). Las lacasas fúngicas son capaces de utilizar una amplia gama de sustratos

incluyendo fenoles, polifenoles y fenoles sustituidos, aminas aromáticas y bencetioles (Trivedi y Chhaya 2021). Por lo tanto, las lacasas tienen un enorme potencial para el biotratamiento de las aguas residuales a nivel biológico y presupuesto económico.

Las lacasas contienen compuestos fenólicos y no fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, tintes sintéticos y varios contaminantes emergentes (Bhandari y cols. 2021). Esta enzima tiene la capacidad catalítica de afectar a la oxidación de compuestos fenólicos, aminas aromáticas y sus compuestos sustituidos que tienen varios grupos funcionales mediante la formación de dos moléculas de agua con la pérdida asociada de electrones de una sola molécula de oxígeno, así como de compuestos no fenólicos que son menos solubles y más estables, lo que ayuda a controlar la contaminación de las aguas subterráneas y submarinas (Chandra y Chowdhary. 2015).

1.3.2 LACASAS

Las lacasas fúngicas suelen presentarse como isoenzimas que se oligomerizan para formar complejos multiméricos. La masa molecular del monómero oscila entre 50 y 100 kDa. Una característica importante es una fracción de carbohidrato unida covalentemente (10-45%), que puede contribuir a la gran estabilidad de las enzimas (Claus, 2004).

El sitio activo de la lacasa (Figura 2) contiene cuatro átomos de cobre que son un cobre de tipo 1 (T1) y un grupo trinuclear (T2/T3) que consiste en un tipo 2 (T2) y dos de tipo 3 (T3). El cobre T1 tiene una coordinación trigonal con dos histidinas y una cisteína, y el ligando axial de T1 es metionina en las bacterias (CotA) y leucina o fenilalanina en las lacasas fúngicas. El cobre T1 confiere el típico color azul a las proteínas multicopistas debido a la fuerte absorción alrededor de 600 nm. Su intensa absorción está causada por el enlace covalente cobre-cisteína. Además, el cobre de tipo 1 es el lugar donde se produce la oxidación del sustrato debido a su alto potencial redox de +790 mV. El alto potencial redox es un factor que contribuye, pero de igual importancia es la accesibilidad del sitio a la superficie, así como el acceso limitado del sustrato al “clúster” trinuclear (Palmer y cols. 2001).

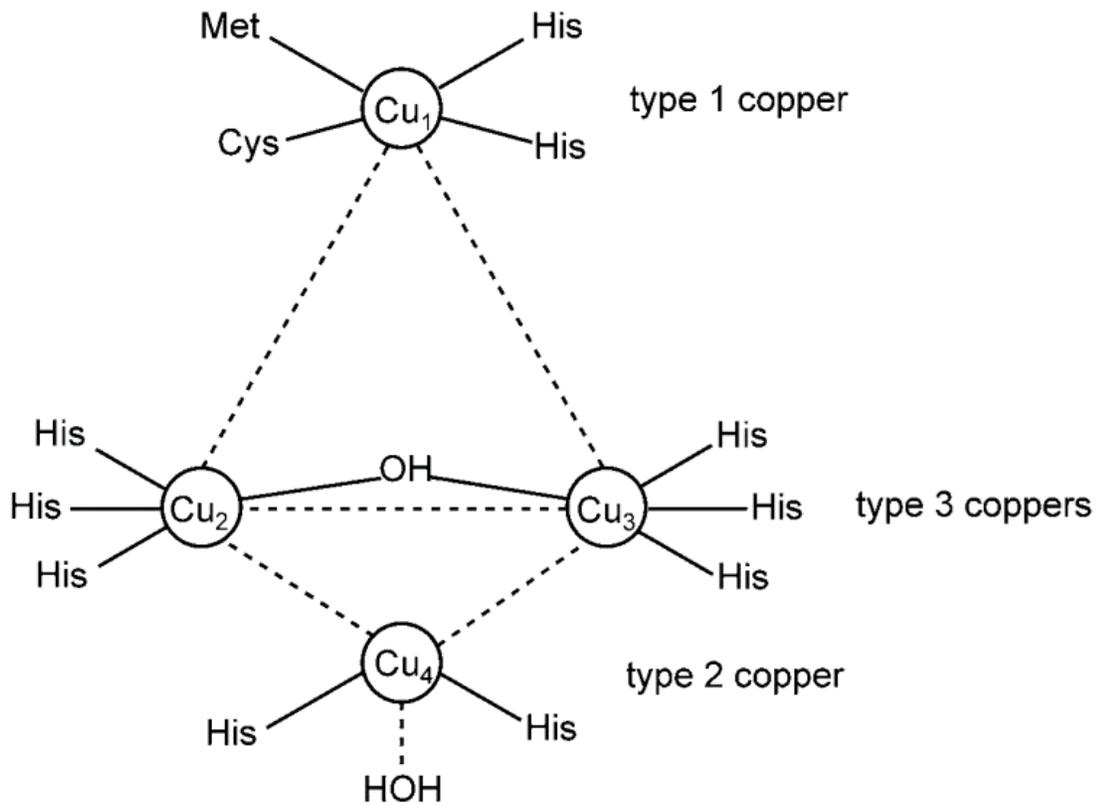


Figura 2. Sitio activo propuesto de lacasa CotA de *Bacillus subtilis* (Witayakran y Ragauskas, 2009).

El tipo 2 está coordinado por dos histidinas y el cobre de tipo 3 están coordinados por seis histidinas (cada cobre T3 se coordina con tres ligandos de histidina). El cobre de tipo 2 muestra sólo una débil absorción en la región visible y revela propiedades paramagnéticas en los estudios de resonancia paramagnética de electrones. Mientras que el cobre de tipo 3 es un sitio de cobre binuclear con cobre emparejado antiferromagnéticamente a través de un puente hidroxilo y no presenta una señal de resonancia paramagnética de electrones. El sitio T3 puede caracterizarse por una absorción de electrones a 330 nm, el cluster trinuclear (sitio T2/T3) es donde tiene lugar la reducción del oxígeno molecular y la liberación de agua (Witayakran y Ragauskas, 2009).

1.3.3 MANGANESO PEROXIDASAS

Las peroxidasas pueden ser una opción alternativa para la despolimerización de una serie de productos químicos tóxicos, eliminando sus persistentes condiciones de reacción (Husain y Qayyum, 2003). Son considerados como un grupo de oxidorreductasas que contienen un grupo hemo y que catalizan la reducción de peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la oxidación de una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Ikehata y cols. 2004).

La Mn-P es una enzima fúngica bien conocida por la degradación y oxidación catalítica de varios compuestos fenólicos en un amplio rango de pH (Sidwaba y cols. 2019). La Mn-P tiene un peso molecular aproximadamente de 47 kDa, un pH de actividad que oscila entre 4.2 - 4.9 (Galvez 2014), es una hemo-peroxidasa que puede oxidar compuestos fenólicos en presencia de Mn(II) y peróxido de hidrógeno. El Mn(II) es oxidado a Mn(III) por la MnP; el Mn(III) resultante forma un compuesto quelante con un ácido orgánico y luego los compuestos orgánicos como el BFA son oxidados por el compuesto quelante (Limura 2007). Las macromoléculas de esta enzima contienen 10 espirales grandes y una espiral pequeña, el ciclo catalítico exhibe tres formas, incluyendo MnP, MnP-I y MnP-II (Shi y cols. 2021). Estas enzimas catalizan la oxidación de varios fenoles y aminas aromáticas como el 2,6-dimetoxifenol, el guayacol, el 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), así como sustratos no fenólicos como el alcohol veratrílico y el 1,4 dimetoxibenceno en ausencia de iones de manganeso (Ikehata y cols. 2004). La acción de la Mn-P depende de la acción combinada de varios compuestos, denominados sustratos cofactores y mediadores, que inician, participan y permiten completar el ciclo catalítico (Mielgo y cols. 2003).

El ciclo catalítico de las Mn-P (Figura 3) se inicia por la unión de H_2O_2 o un peróxido orgánico a la enzima férrica nativa y la formación de un complejo hierro-peróxido. La posterior ruptura del enlace oxígeno-peróxido requiere una transferencia de 2 electrones del hemo que da lugar a la formación del compuesto I de la Mn-P, que es un complejo Fe^4 -oxo-porfirina-radical. Posteriormente, el enlace dioxígeno se escinde heterolíticamente y se expulsa una molécula de agua.

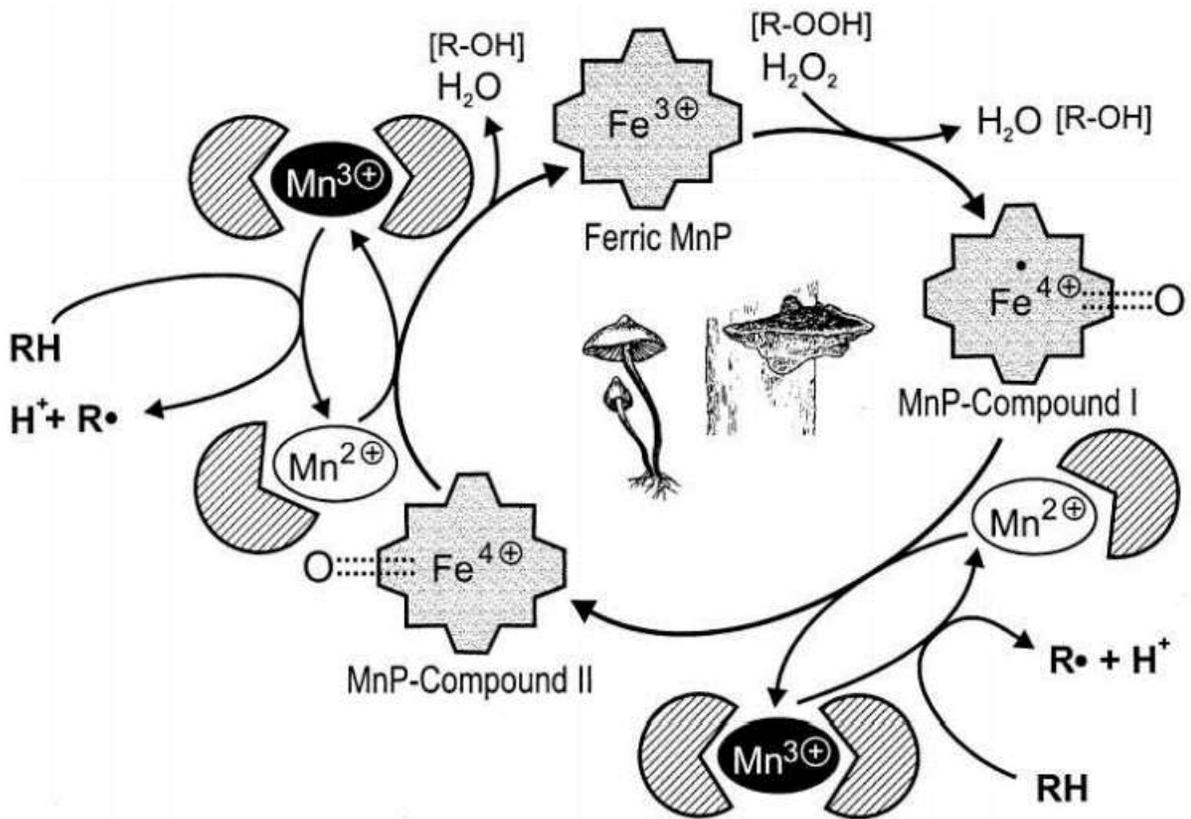


Figura 3. Ciclo catalítico de Mn-P (Hofrichter 2002).

La reducción posterior procede a través del compuesto II de Mn-P (complejo Fe⁴⁺-oxo-porfirina). Un ion Mn²⁺ monocelado actúa como donante de un electrón para este intermedio de porfirina y se oxida a Mn³⁺ (Hofrichter 2002). La reducción del Compuesto II procede de forma similar y se forma otro Mn³⁺ a partir de Mn²⁺, lo que lleva a la generación de la enzima nativa y a la liberación de la segunda molécula de agua. Mientras que el compuesto I de la Mn-P se asemeja a la de Li-P y puede, además de Mn²⁺ ser reducido por otros donantes de electrones como el ferrocianuro y los fenólicos, el compuesto MN-P II sólo se reduce muy lentamente por otros sustratos y requiere Mn²⁺ para completar el ciclo catalítico. El Mn³⁺ formado es estabilizado por ácidos orgánicos como como el oxalato y actúa a su vez como un mediador redox difusible de baja masa molecular que ataca a las moléculas orgánicas de forma inespecífica mediante la abstracción de hidrógeno y de un electrón. La Mn-P es sensible a altas concentraciones de H₂O₂

que causan la inactivación reversible de la enzima mediante la formación de compuesto III, un estado de oxidación catalíticamente inactivo (Wariishi y cols. 1988).

1.4 HONGOS ASCOMICETOS

Los hongos son una de las formas de vida más ubicua en el ambiente, estos desempeñan papeles fundamentales en la degradación de compuestos biológicos y tóxicos (Martins y cols. 2014). Los hongos filamentosos como los que son parte del grupo de los ascomicetes han sido reconocidos por su contribución amplia en el sector industrial (Ferreira y cols. 2015). Son un grupo amplio de microorganismos que ha contribuido a la biotecnología, como *Aspergillus spp.*

El *Aspergillus spp.*, es uno de los hongos más estudiados a escala industrial involucrado en productos de valor agregado que incluyen enzimas como la amilasa, proteasa, lipasa, fitasa, lactasa y catalasa (Ferreira y cols. 2016). Este grupo de hongos tienen ventajas sobre bacterias y levaduras por su sistema enzimático extracelular que puede producir cuando están adecuadamente inducido, junto con la importante penetración de sus hifas (Sharma y Arora 2013, Ferreira y cols. 2016). Su uso como herramienta de biorremediación es una estrategia para degradar algunos compuestos xenobióticos, como el BFA. Estudios recientes sugieren que estos organismos han sido estudiados por su potencial producción de enzimas involucradas en la biorremediación. Los hongos denominados filamentosos son organismos altamente adaptables y capaces de crecer en condiciones ambientales extremas, la versatilidad de crecimiento con la que estos hongos cuentan está relacionada con las enzimas que producen (Ferreira 2016), incluso tienen la capacidad de crecer sobre áreas contaminadas como desechos de papel de oficina (Ikeda y cols. 2016), sobre granos de la industria cervecera (Xiros y Christakopoulos, 2009) y también sobre compuestos y elementos químicos potencialmente tóxicos, como el BFA u otros compuestos análogos a este (Bučková y cols. 2007, Ahuactzin-Pérez y cols. 2018). El crecimiento de estos hongos puede ser en filamentos uniformes largos y distribuidos uniformemente a través del medio o estos filamentos pueden formar grupos o pellets, el medio es el que influencia la forma de crecimiento (Gibbs y cols. 2000). Cuando los hongos dan lugar a suspensiones densas de micelio, el medio tiende a ser viscoso, lo que implica que el oxígeno

y otras resistencias involucradas en la transferencia de masa se conviertan en factores limitantes. En comparación con los pellets que son la forma más adecuada para fermentaciones de alto rendimiento, estos se consideran la morfología más ventajosa del crecimiento fúngico, por ejemplo, para la producción de enzimas y ácidos por *A. niger* (Ferreira y cols. 2013).

1.5 GENERO ASPERGILLUS

El género *Aspergillus* abarca más de 340 especies oficialmente aceptadas estos hongos filamentosos son los más comunes y son ampliamente distribuidos en la tierra (Bennett, 2010). Incluso, pueden ser aislados a partir de una extensa gama de sustratos. Este género ha sido estudiado por sus propiedades industriales, de deterioro y aplicaciones biotecnológicas (Alvarenga y cols. 2012).

Los hongos del género *Aspergillus* se reproducen principalmente mediante la formación de esporas asexuales (conidios) producidas en estructuras multicelulares llamadas conidioforos. Basado en la morfología similar de estos conidióforos con un aspergillum (rociador de agua bendita), el género *Aspergillus* fue nombrado por el sacerdote-biólogo italiano Pier Antonio Micheli (Bennett, 2010).

El ciclo de vida de este género comienza con las células de los hongos que son conocidas como células pie, y cada una produce como consecuencia una rama erguida. Esta es el conidióforo joven. El ápice del conidióforo se hincha en una cabeza multinucleada elíptica o globular llamada vesícula. Forma muchos arreglos tubulares dispuestos radialmente llamados esterigmas o fiálides; en algunas especies, los esterigmas primarios (uniseriados) tienen esterigmas secundarios (biseriados) (Pontón y cols. 2002). Los conidios surgen exógenamente de los esterigmas o fiálides (por lo que también se les llama fialosporas o fialoconidios) por abstracción y están dispuestos en sucesión basípeta (es decir, el conidio más joven se encuentra en la base y el más antiguo en el ápice). Los esterigmas se alargan en el ápice para formar un tubo. Los conidios se forman dentro de estas estructuras. Los esterigmas son uninucleados y en el momento de la formación de los conidios, cada núcleo se divide mitóticamente en dos núcleos hijos. Uno de estos núcleos hijos pasa al tubo y se forma el primer conidio. A medida que este se forma, la pared superior rota del fiálide y se forma una capucha alrededor. El segundo conidio

está formado por esterigmas que se encuentran justo debajo del primero (Figura 4). El citoplasma de ambos conidios confluye a través de una estrecha unión llamada istmo. La continuidad del citoplasma se detiene por la formación de la pared conidial interna, el istmo se vacía y ahora se llamará conectivo (Ancasi y cols. 2006). Al germinar un conidiosporo de *Aspergillus* en un medio favorable produce un micelio vegetativo del cual nacen los conidióforos que terminan en una vesícula aspegilar; de ella se originan una o varias filas de esterigmas y a partir de estos se forman los conidiosporos y al caer de nuevo al medio el ciclo asexual (Raisman y Gonzalez, 2008).

Este género incluye especies importantes como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *A. terreus*, debido a su versatilidad metabólica estos hongos se destacan de otras poblaciones microbianas de origen bacteriano o levaduras por su capacidad de tolerar condiciones de cultivo extremas como temperaturas que van desde los 10 a los 50°C, un rango de pH de 2 a 11, en un porcentaje de salinidad de 0 a 34%, en una actividad de agua de 0.6 a 1 y ambientes oligotróficos o ricos nutrientes (Meyer y cols. 2010). El libro “El género *Aspergillus*” es básico para la identificación de estos hongos, los criterios morfológicos han sido utilizados para la clasificación de las especies de este género y sus teleomorfos, esto se basa en utilizar medios de cultivo diferenciales y temperaturas de incubación que permitan el desarrollo óptimo de características que puedan ser utilizadas en la identificación, las características micro y macroscópicas que principalmente son utilizadas en la clasificación a nivel de especie incluyen el diámetro de las colonias, la coloración de anverso y reverso de las colonias, la presencia de esclerocios, las gotas de exudado y pigmento difusible, la textura de las colonias, la disposición de métulas o fiálides sobre la vesícula, las medidas de los estipes, vesículas, métulas y fiálides, la ornamentación y color de las conidias, de las células de Hülle y de las ascosporas (Alvarenga y cols. 2012).

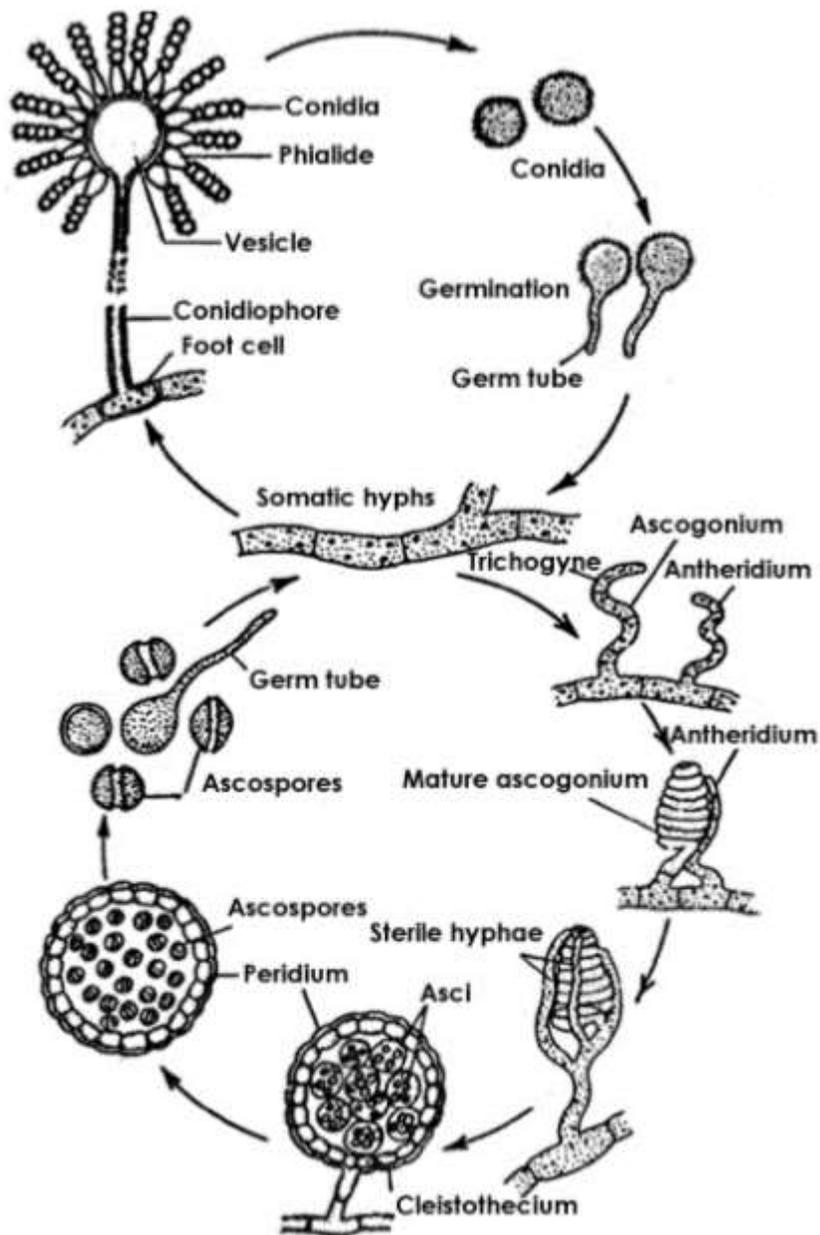


Figura 4. Ciclo de vida de *Aspergillus* sp. (Akar y cols. 2007).

Los hongos *Aspergillus* tienen la capacidad de producir varios metabolitos secundarios. Aunque los metabolitos secundarios no están directamente implicados en el crecimiento y desarrollo normal de un organismo, algunos juegan papeles importantes en la virulencia, la defensa del huésped y la supervivencia del medio ambiente (Park y cols. 2017). Las especies de

Aspergillus producen metabolitos secundarios que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para el ser humano. Algunos ejemplos como las estatinas y los antibióticos son productos beneficiosos. Las estatinas son un grupo de compuestos reductores del colesterol que actúan inhibiendo la HMGCoA reductasa, reduciendo así el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Zhou y Liao, 2009). La lovastatina, la primera estatina aprobada por la USFDA en 1987, es producida por *A. terreus* y fue comercializada por Merck. *A. fumigatus* puede producir piripropeno, que es otro agente reductor del colesterol que inhibe el acil CoA: colesterol aciltransferasa (Park y cols. 2017). El conocido antibiótico, penicilina, es producido por varias especies de *Aspergillus* incluyendo a *A. nidulans*.

Muchas especies de *Aspergillus*, también, son utilizadas para la producción de enzimas, fermentaciones de alimentos, biotecnología y producción de productos farmacéuticos (Park y cols 2017). Este género también es responsable de una fracción importante en la producción de ácido glucónico, ácido itacónico y también son fuentes potenciales de ácido málico y oxálico (Pandey y cols. 2015). Los procesos de fermentación se optimizaron mediante el empleo de cepas de *Aspergillus* especialmente seleccionadas para producir enzimas purificadas y bien caracterizadas en gran escala. La mayoría de las enzimas industriales que se utilizan actualmente son hidrolíticas en acción, es decir, se utilizan para la degradación de diversas sustancias (Park y cols. 2017). Las características anteriores nos sugieren que *Aspergillus* son los principales agentes de descomposición de diversas sustancias orgánicas por lo que pueden usarse en fermentaciones en estado sólido o sumergido ya que se ha reportado el uso de estos en protocolos de fermentación de procesos industriales para la producción a gran escala de enzimas (Meyer 2010).

1.5.2 CONSORCIOS

Las diversas interacciones interespecíficas que hay entre especies dan forma a la estructura y a las funciones de la comunidad (Klitgord y cols. 2011). Las principales interacciones entre hongos son el coantagonismo que se refiere a cualquier interacción que muestre un resultado negativo para ambos miembros, el antagonismo que es referido a un hongo que inhibe el crecimiento del otro, mientras continúa creciendo sin inhibirse, el agonismo que es definido

como una interacción en la que un organismo es dañado y el otro se beneficia. Por otro lado, también existe la cohabitación que es una interacción más o menos neutra en la que ninguno de los organismos implicados se ve afectado de manera significativa, ni positiva ni negativamente, el comensalismo que es una interacción en la que un organismo no se ve afectado y el otro se beneficia. Por último, el mutualismo que es una interacción en la ecología fúngica interespecífica en la que ambos organismos se benefician, haciendo que los micelios de dos especies diferentes de hongos se entremezclen sin inhibirse (Figura 5) (Tuininga 2005).

La variedad de funciones y la división del trabajo permite a las comunidades microbianas reusar los nutrientes y realizar funciones complicadas de manera más eficiente que poblaciones individuales (Che y Men. 2019). Se le llama consorcios a los grupos de dos o más especies que pueden coexistir (VerBerkmoes y cols. 2009), las interacciones que involucran microorganismos determinan la estabilidad y las funciones de los consorcios microbianos, así como la resistencia ambiental y su gran diversidad metabólica es importante para mantener funciones deseadas en los procesos de biorremediación y bioproducción (Che y Men. 2019). Las asociaciones de dos o más especies de microorganismos, son combinaciones conocidas como consorcios microbianos, estos consorcios pueden formarse a partir de especies bacterianas, fúngicas o una combinación de ambas, llamados consorcios mixtos, estas asociaciones pueden llevar a cabo procesos de degradación con mayor eficiencia (Saratale y cols. 2009, Malaviya y Rathore, 2007), la diversidad de vías metabólicas que caracteriza a cada miembro del consorcio facilita la supervivencia y adaptabilidad de éste en entornos subóptimos, es decir, la carencia de sustratos fácilmente disponible o bien en presencia de compuestos tóxicos (Lapara y cols. 2002).

Cuando los microorganismos se encuentran expuestos a limitaciones nutricionales u otros factores de estrés, estimulan interacciones benéficas de subsistencia, resultado de su asociación con otros organismos (Bottomley, 2004). El establecimiento de consorcios microbianos está determinado tanto por las condiciones nutricionales, generalmente limitadas, como por la compatibilidad sinérgica, la cual influye en la proporción de especies que participan en él para obtener una asociación exitosa (Molla y cols. 2001).

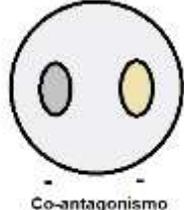
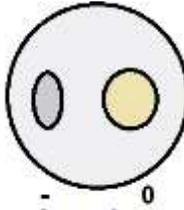
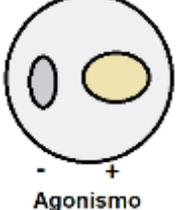
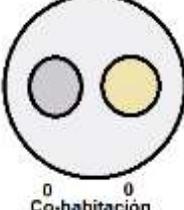
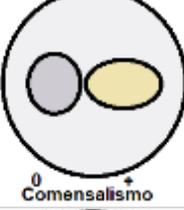
Tipo de interacción	Descripción	Imagen
Coantagonismo	Cualquier interacción que se obtenga entre la cepa desafiante y la desafiada de un resultado negativo para ambas colonias (-/-)	
Antagonismo	La cepa desafiada crece radialmente inhibiendo el crecimiento lateral de la cepa desafiante. En el caso de que ambas sean desafiantes la colonia lateral derecha o izquierda manifiesta disminución general del tamaño de la colonia, independientemente de la dirección, con respecto a la colonia central (- / 0).	
Agonismo	La colonia desafiante incrementa su crecimiento vegetativo sin permitir el crecimiento de la colonia desafiada. Esto igual ocurre al ser centro vs lateral derecho o izquierda (+ / -).	
Co-habitación	Ambas colonias crecen sin entrecruzar sus hifas (0 / 0)	
Comensalismo	La colonia desafiada crece sin afectar el crecimiento de la colonia desafiante. Cuando se encuentra como desafiante central, ambos laterales crecen en dirección de la colonia central sin verse afectado su crecimiento (0 / +).	
Mutualismo	Tanto la colonia desafiada como la desafiante crecen sin afectar sus crecimientos, existe entrecruzamiento de hifas. Esto ocurre de igual forma en los sentidos laterales al ser desafiante central (+ / +).	

Figura 5. Interacciones interespecíficas de hongos y definiciones.

Los consorcios microbianos pueden tener mayor resistencia a fluctuaciones del ambiente, por ejemplo, pH, temperatura, nutrientes y la presencia de compuestos tóxicos (Burmolle y cols. 2016). Este concepto de consorcio se ha vuelto prometedor para la resiliencia, así como para las biotecnologías rentables ya que existen especies claves, como las del género *Aspergillus* que llevan a cabo las funciones deseadas de forma cooperativa en función de los principios de interacción microbiana en la naturaleza. (Che y Men. 2019)

1.5.2 CONSORCIOS FÚNGICOS

La organización del consorcio se basa en la comunicación celular a través de señales moleculares por metabolitos que conducen a la división del trabajo para producir una funcionalidad particular. La utilización de múltiples sustratos de manera paralela en el tiempo por el consorcio cumple el principio de máxima potencia. Asimismo, la máxima potencia reivindica la superioridad del consorcio sobre las especies individuales para diseñar interacciones microbianas para la biorremediación en lo que respecta a la gestión del medio ambiente. Mientras, la biodegradación de los plásticos necesita una mineralización completa que se ejecuta mediante las diversas enzimas y sus vías sintéticas que normalmente no existen en una sola cepa y que es fácilmente realizada por un consorcio fúngico (Jaiswal y cols. 2019).

Un consorcio fúngico (CF) es una asociación natural de dos o más poblaciones de hongos, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. Este puede desempeñar funciones complicadas que poblaciones individuales no podrían; además, la vida en asociación puede generar mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de los miembros, en el tiempo, así como un mayor rango de genes y capacidades metabólicas en comparación con los monocultivos (Ochoa y Montoya. 2010).

El establecimiento de CF está determinado tanto por las condiciones nutricionales, generalmente limitadas, como por la compatibilidad, la cual influye en la proporción de las especies que participan en el consorcio. Dado que un consorcio fúngico desempeña funciones muy importantes para la biodegradación de compuestos recalcitrantes, al potenciar la actividad enzimática por efecto sinérgico entre las especies participantes, la evaluación preliminar de su

compatibilidad constituye un requisito previo para una posible asociación exitosa entre las especies (Rojas y Homarza, 2014).

Se ha mostrado que el uso de consorcios aplicados en procesos de biorremediación formados a partir de especies fúngicas que tienen interacciones interespecíficas que explican su comportamiento en un mismo medio, en particular, las pertenecientes a los géneros, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Fusarium*, encontrando que su asociación es más eficiente para emplearlos en procesos de degradación y eliminación de xenobióticos que si se utilizaran de manera individual (Rajendran y cols. 2012).

1.6 FERMENTACIÓN SUMERGIDA

El cultivo de hongos en diversas corrientes de desechos a escala industrial se ha llevado a cabo principalmente en modo de fermentación sumergida, ya que es un proceso rápido y relativamente fácil a grandes escalas (Gmoser y cols. 2019). La fermentación sumergida es un proceso en el que el crecimiento de microorganismos se lleva a cabo en un medio de cultivo líquido el cual está optimizado con los nutrientes necesarios para tener un cultivo efectivo de microorganismos, esto depende de diversos factores como la temperatura, el pH, la composición de los nutrientes adicionados, la concentración de inoculación, la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo que dure la fermentación (Doriya y cols. 2016). Las ventajas de la fermentación sumergida sobre la fermentación sólida es la rápida producción de metabolitos secundarios, la tasa alta de reproducción de los microorganismos, la producción mínima de residuos, la mejor difusión de los microorganismos, mejor transferencia de calor, masa y oxígeno (Gupta y cols. 2018, Kosseva 2013), la fermentación sumergida potencializa la capacidad del hongo de hidrolizar macromoléculas complejas, degradar compuestos antinutricionales y aumentar el contenido biodisponible de zinc, hierro, calcio y fósforo inorgánico (Gupta y cols. 2018). Debido a la diversidad de ventajas que presenta la fermentación sumergida sobre la fermentación sólida respalda el uso de este tipo de fermentación para el cultivo de consorcios microbianos empleados en la degradación de BFA.

2. ANTECEDENTES

En el 2005, Takita cols. utilizaron 16 cepas fúngicas evaluadas por su capacidad de degradar inhibidores endócrinos como el BFA y la benzofenona. Más del 79% del BFA se degradó por el cultivo de *Aspergillus oryzae*, *Cheatomium globosum*, *Penicillium janthillum* LM12 y *Rhizopus oryzae*, todos ellos hongos no ligninolíticos. La degradación de la benzofenona se mantuvo por debajo del límite de detección por los cultivos de *Cladosporium* sp. DD618, *Geotricum candidum* y *Rhizopus oryzae*.

Estudios de Wen cols. (2005) evaluaron la degradación de BFA utilizando 26 cepas de hongos no ligninolíticos a una concentración inicial de crecimiento de 40 ppm y en condiciones de oscuridad, durante 14 días de incubación. Las cepas *Fusarium sporotrichioides* NFRI-1012, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus terreus* MT-13, y *Aspergillus nidulans* MT-98 resultaron eficientes en la degradación de este compuesto, reduciendo más del 50 % de la concentración inicial.

Córdoba y cols., (2009) evaluaron *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* para seleccionar un consorcio y las condiciones de operación apropiadas para evaluar la tratabilidad de un agua residual de origen textil como alternativa no convencional de tratamiento. Se realizaron pruebas de decoloración *in vitro* con un colorante representativo de un grupo químico. Los factores que favorecieron la decoloración del consorcio formulado a base de *P. ostreatus* y *P. chrysosporium* fueron, emplear el agua residual al 100% sin suplemento de C/N, a pH 8.0, 120 rpm, 30 °C por 4 días. Bajo estas condiciones la decoloración fue del 99% con remociones de 75% para demanda química de oxígeno y actividad enzimática de 21 U/L (lacasa), 0.1 U/L (MnP) y 191 U/L (Lignin peroxidasa).

En Djelal y cols. (2013), analizaron un consorcio fúngico que incluía *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* y *Galactomyces geotrichum* para el tratamiento de aguas residuales lácteas. El método de bio-aumento se probó a escala de laboratorio (4 L), a escala piloto (110 L) y a escala industrial en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) la reducción significativa del aumento de la relación de la demanda química de oxígeno en DBO5 entre la entrada y la salida del tanque biológico de la PTAR. Estaba en el rango de 451% –1111% antes de agregar el

consorcio fúngico, y en el rango de 257% –153% después del bio-aumento con hongos. Se desarrolló un biorreactor inoculado con consorcio de hongos a escala de laboratorio y se demostró con éxito a escala piloto en la PTAR.

Un año más tarde, Gasser y colaboradores (2014) estudiaron la capacidad de las enzimas Mn-P, lignina peroxidasa y lacasa, en estado libre y encapsulado (para degradar BFA). Se obtuvo una mayor degradación de BFA (90%) mediante enzimas ligninolíticas encapsuladas en hidrogel de poliacrilamida y pectina después de 8 horas de su exposición. La degradación del BFA durante el uso de la enzima libre fue del 26%, considerada menor con respecto a las enzimas encapsuladas. La presencia de pectina en la formulación mejoró significativamente la actividad de las enzimas. La cinética de degradación de BFA mostró un aumento en la V_m (velocidad máxima), mientras que la K_m (constante de velocidad de Michaelis) permaneció constante cuando las enzimas se encapsularon. Por lo tanto, la encapsulación protegió las enzimas de la inhibición no competitiva

Fouda y cols. (2015) aislaron hongos de suelos contaminados del Cairo Egipto, propagando los que fueran capaces de crecer y degradar concentraciones de BFA y cuantificaron su toxicidad a través de la línea celular en mamíferos obteniendo también por medio de cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas (GC-MS), los productos que se identificaron son los siguientes: thiopropionamide, Methanone, (3-amino-2- benzofuryle) (4-chlorophenyle), 1Hpyrazol, 4,5-dihydro-5,5-dimrthyle-4-isoprpylidene, Phenol, 2,4-isopropylidenedi, Phenol, 2,6bis (1,1-dimetiletil) -4- (1-metil-1-feniletil), bis (2-etilhexilo) ftalato. La toxicidad del BFA se redujo luego de ser metabolizada por los hongos seleccionados.

Un año después, Volke-Sepulveda y cols., (2016) evaluaron el comportamiento metabólico de *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 en fermentación sólida a alta concentraciones de glucosa mediante un enfoque proteómico. El análisis respirométrico en línea proporcionó muestras reproducibles para los estudios secretómicos cuando se produjo la tasa máxima de producción de CO_2 , asegurando estados fisiológicos consistentes. El extracto extracelular de los cultivos de la fermentación líquida fueron tratados por SDS-PAGE, digeridos con tripsina y analizados por LC-MS/MS. De las 531 secuencias identificadas, se analizaron 207 proteínas. Veinticinco fueron identificadas como proteínas no reguladas más abundantes; 87 fueron reguladas al alza y 95 a la baja con el aumento de la concentración de glucosa. De las

proteínas reguladas, 120 eran enzimas, la mayoría implicadas en el metabolismo de carbohidratos (51), aminoácidos (23) y nucleótidos (9). Este estudio mostró la elevada actividad secretora de proteínas de *A brasiliensis* en condiciones de fermentación sólida. La alta concentración de glucosa favorece las actividades catabólicas, mientras que algunas proteínas relacionadas con el estrés y las implicadas en la proteólisis están reguladas a la baja.

Praveen y cols. (2016), desarrollaron un consorcio de hongos efectivo para la biorremediación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) y petróleo crudo. De las 45 cepas aisladas de suelo contaminado con petróleo crudo, cuatro hongos mostraron la máxima degradación, identificados como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus aculeatus*, *Scedosporium boydii* y *Aspergillus* sp. El proceso de degradación para este consorcio fue más optimizado utilizando el método de superficie de respuesta (RSM).

Wen y cols. (2016), aislaron una nueva Mn-P producida por *Echinodontium taxodii* 2538 en medio de lignocelulosa natural de aserrín de bambú. Los parámetros cinéticos revelaron que la Mn-P tuvo la mayor afinidad hacia $MnSO_4$ como sustrato. Se analizó la degradación de diferentes tipos de compuestos modelo de lignina por Mn-P y reveló que la enzima podía oxidar unidades de lignina tanto fenólicas como no fenólicas.

Trivedi y Chhayara (2021), estudiaron la biotransformación del BFA utilizándola enzima lacasa de *Trametes versicolor*. Se llevó a cabo el cribado de varios parámetros que pueden afectar al sistema micelar utilizando el diseño experimental de Plackett-Burman y el diseño compuesto central (Design Expert). Según Design Expert la concentración real de las diferentes variables fue de 0.55 150 (Wo 30), 0,0035 mM y 175 μ g/ml para los iones Mg^{+2} , la relación de hidratación (Wo), 2,6-dimetoxifenol (2,6 DMP, sustrato) y lacasa, respectivamente, a 40 °C y pH 4,5. En estas condiciones la actividad de la lacasa en las micelas inversas se multiplicó por dos en comparación con el sistema micelar no optimizado. El diámetro de las micelas inversas era linealmente proporcional a la cantidad de enzima lacasa incorporada. La biorremediación del BFA mediada por la lacasa en medio no acuoso resultó ser del 84% en 8 h de tratamiento. La biotransformación del BFA se monitorizó mediante GC-MS. Los productos degradados del BFA, como el BFA-O-cateol y el 4,4 (etano 2-oxi 2-ol) difenol fueron identificados indicando la transformación por oxidación.

3. JUSTIFICACIÓN

El bisfenol A es un contaminante que está presente en muchas matrices ambientales debido a la alta demanda y a su escasa regulación México. Es un compuesto orgánico contaminante y los mamíferos, entre ellos los humanos, tienen distintas vías de contacto (oral, dérmica y olfativa), su larga período de exposición desencadena alteraciones fisiológicas y nocivas para los organismos. Debido a la poca o nula aplicación de estrategias biorremediales, el BFA se acumula en el ambiente y organismos expuestos. Sin embargo, investigaciones sobre el uso de hongos ascomicetos y la utilización de las enzimas extracelulares para biorremediar el ambiente, se conoce que este grupo de organismos disminuye de forma significativa la toxicidad de xenobióticos. Su complejo enzimático extracelular tiene la capacidad de reducir y romper enlaces de los polímeros del plástico, como el BFA, particularmente los hongos del género *Aspergillus* se caracterizan por su alta adaptabilidad y capacidad de crecimiento en sustratos contaminados y a condiciones extremas en el medio, así como la capacidad de crecer, no solo de forma individual, sino de formar consorcios fúngicos y poder utilizarse en procesos biotecnológicos o de biorremediación. Esto resulta una nueva estrategia o alternativa agradable para el ambiente y economía sobre la degradación de contaminantes, como el BFA. Además, de que las estrategias de biorremediación son potencializadas al utilizar distintos sistemas metabólicos incluidos en un consorcio fúngico, al tener distintas especies y ser capaz de crecer de forma conjunta y formar asociaciones simbióticas; mimetizando lo que sucede de forma natural en un ambiente. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación es determinar el mejor consorcio fúngico del género *Aspergillus* para crecer en un cultivo con BFA; con base a su máxima tolerancia a BFA, crecimiento en un sistema de cultivo líquido en presencia de bisfenol-A y posteriormente su capacidad de degradación.

4. HIPÓTESIS

El consorcio fúngico de *Aspergillus* es capaz de crecer y degradar eficientemente el BFA en condiciones de fermentación sumergida.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la degradación de BFA empleando un consorcio fúngico de *Aspergillus* en fermentación sumergida.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Formar el consorcio fúngico de *Aspergillus* con base en su máxima tolerancia a BFA en fermentación sumergida.
- Estandarizar las condiciones óptimas para el crecimiento del consorcio fúngico de *Aspergillus* y degradación en fermentación sumergida.
- Medir la actividad de las enzimas lacasas y manganeso peroxidasas producidas por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con y sin la adición de BFA.

6. METODOLOGÍA

6.1 Etapa 1: Formación del consorcio fúngico y caracterización de las condiciones de crecimiento.

Los organismos de estudio fueron *Aspergillus niger* SCB, *A. niger* 321, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* sp, *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus* sp, *A. terreus* ATCC10029, *A. nidulans*, los cuales se encuentran en el laboratorio de Biología experimental de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

6.1.2 Prueba de medios

Los hongos antes mencionados se crecieron sobre agar Czapek (NaNO₃ 2g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄ 0.5g, KCl 0.5g, FeSO₄ 0.01g, Glucosa 10g y Agar 15g), Toyamas ((NH₄)₂SO₄ 1g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 3g, CaCl₂ 0.5g, NaCl 0.1g, FeSO₄ 0.001g, Glucosa 10g y Agar 15g) y agar GYE (KH₂PO₄ 0.9g, K₂HPO₄ 0.6g, CuSO₄ 0.3g, FeSO₄ 0.05g, MnSO₄ 0.05g, ZnSO₄ 0.01g, Extracto de levadura 5g, Glucosa 10g y Agar 15g) contaminados con 200 ppm de BFA y sin BFA. Se

midió el crecimiento radial cada 24h y se analizaron los resultados para conocer el mejor medio de cultivo que promovía el crecimiento de la mayoría de los hongos y el rango de las concentraciones a evaluar en la prueba de tolerancia.

6.1.3 Prueba de tolerancia

Las cepas se crecieron en cajas de Petri con el medio seleccionado de la prueba anterior, el medio Toyamas, adicionando las concentraciones dentro del rango seleccionado con base en el experimento anterior, 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500ppm. La determinación de esta variable se analizó siguiendo la metodología modificada de Reyes-César y cols. (2014) y Zafra y cols. (2014).

6.1.4 Prueba de antagonismo

Para la formación del CF se le asignó un número a cada hongo para controlar su posición como desafiado o desafiante (Tabla 1).

Tabla 1. Control de numeración de hongos

No.	Hongos
1	<i>A. niger</i> 321
2	<i>A. niger</i> SCB
3	<i>A. niger</i> Mn-P
4	<i>A. nidulans</i>
5	<i>A. flavus</i> NRRL3357
6	<i>A. flavus</i> 1V

Se realizó una evaluación antagonista *in vitro* de hongo a hongo (Figura 6) que actuaron como desafiados y desafiantes, usando placas de medio mínimo en ausencia y presencia de 200ppm de BFA, concentración que se seleccionó de la prueba de tolerancia.

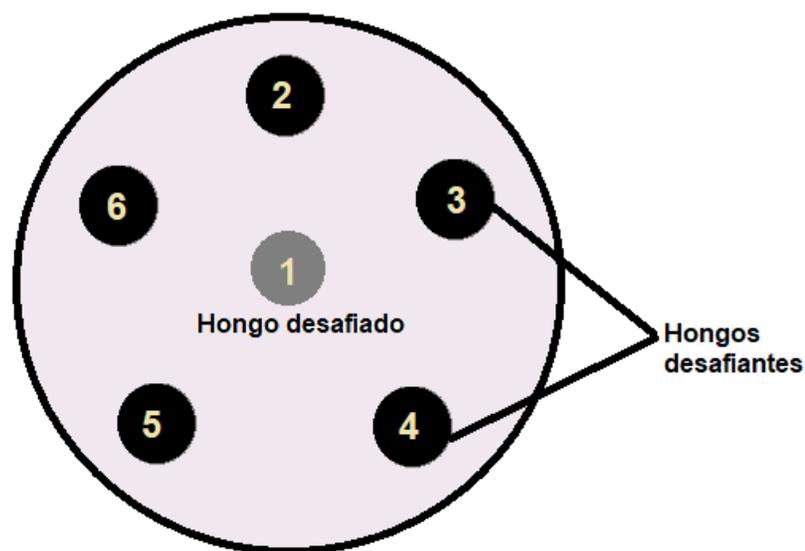


Figura 6. Prueba de antagonismo hongo desafiado vs hongos desafiantes.

Se realizaron observaciones microscópicas para determinar si hay algún efecto antagónico entre los microorganismos (Zafra y cols. 2017).

La obtención de resultados cualitativos se realizó con base en las interacciones que cada hongo tenía, a cada interacción se le otorgó un número (Tabla 2) para poder determinar el porcentaje de antagonismo entre ellos.

Tabla 2. “Score” de interacciones entre hongo-hongo para prueba cualitativa

INTERACCIÓN	SCORE
Coantagonismo	10
Antagonismo	8
Agonismo	6
Co-habitación	4
Comensalismo	2
Mutualismo	0

6.2 Etapa 2: Crecimiento del CF en fermentación líquida, análisis de intermediarios de degradación del BFA

6.2.1 Fermentación líquida/sumergida

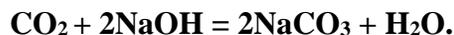
Se emplearon 4 tratamientos como diseño experimental para las fermentaciones líquidas: 1) Medio Toyamas con CF, 2) Medio Toyamas con BFA y con CF, 3) Medio Toyamas con BFA y 4) Medio Toyamas. Para cada tratamiento se emplearon matraces de 125 mL conteniendo 50 mL del medio de cultivo seleccionado al inicio del experimento. Todos los tratamientos fueron inoculados con 1×10^4 esporas/mL de cada hongo que formó parte del CF. Las condiciones de cultivo fueron a 120 rpm, a 30 °C durante 12 días. Se tomaron 3 matraces cada 48 hrs de cada tratamiento para evaluar las variables de respuesta.

Las variables de respuesta fueron:

- 1) Biomasa del consorcio empleando la técnica de peso seco.
- 2) Producción de CO₂.
- 3) pH.
- 4) Consumo de azúcares.
- 5) Actividad enzimática de lacasas y manganeso peroxidasas.

6.2.2 Producción de dióxido de carbono

La emisión de CO₂ se estimó durante 12 días de la fermentación cada 24h con el método de incubación en medio cerrado con 5 mL de NaOH 1N descrito por Anderson (1982), y el desprendimiento de CO₂ se estimó mediante titulación con HCl 0.1N, en presencia de tres gotas de fenoftaleína al 1% y luego de la precipitación de los carbonatos con 3mL de BaCl₂ al 2%. El CO₂ liberado durante la respiración aeróbica puede ser adsorbido en solución alcalina y medida como un índice de la tasa de respiración. La reacción en la cual el CO₂ es adsorbido es:



La cantidad de CO₂ adsorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumido. Para determinar esto, se precipitó el carbonato (CO₃²⁻) con BaCl₂ y se tituló el remanente NaOH con HCl. De la diferencia entre la cantidad de NaOH presente inicialmente y la remanente después de la exposición al CO₂ se obtiene la cantidad de gas producido por respiración. La acumulación

de CO₂ se determinó únicamente sumando los mg de CO₂ que se producían cada día, con los mg de CO₂ de días anteriores (Guerrero-Ortíz y cols. 2012).

6.2.3 Perfiles de pH

El perfil del pH durante el crecimiento del consorcio fúngico se midió en los sobrenadantes empleando un potenciómetro Hanna instruments HI 9811-5, a cada una de las muestras.

6.2.4 Determinación del consumo de glucosa

Se cuantificó la cantidad de azúcares reductores por el método DNS (ácido dinitro salicílico). A 50 µL del ECE y 950 µL de agua destilada se le agregó 2 mL del reactivo DNS (hidróxido de sodio 1%, sulfito de sodio 0.05%, fenol 0.2% y DNS 1%). La solución de reacción se sometió a ebullición por 5 min, se dejó enfriar, posteriormente, se leyó a una absorbancia de 575 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro “Spectronic 21D Milton Roy” (Miller 1959). Se realizó una curva de calibración con glucosa.

6.2.5 Actividad y parámetros cinéticos de producción de lacasas

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustrato el 2,6-dimetoxifenol (DMP) (SIGMA) a una concentración de 2mM en buffer de acetatos 0.1 M y pH de 4.5. La mezcla de reacción (900 µL de sustrato y 100 µL de ECE) se incubó a 39°C por 1 min. La reacción se detuvo por la adición de 475 µL de dimetil sulfóxido (SIGMA). Se leyó la absorbancia a 468 nm en un espectrofotómetro “Spectronic 21D Milton Roy”. Una unidad de actividad de lacasas es la cantidad de enzima que provoca incrementos de 1.0 unidad en la absorbancia por minuto de incubación (Díaz y cols. 2013).

6.2.6 Actividad y parámetros cinéticos de producción de Mn-P

La actividad de Mn-P se determinó a partir de la adaptación de la metodología de Kuwahara y cols. (1984), la mezcla de reacción se formuló con: 100 µL de rojo fenol al 0.1 %, 100 µL de lactato de sodio 250 Mm, 200 µL de albumina de huevo al 0.5 %, 50 µL sulfato de manganeso

(MnSO₄) 2Mm, 50 µL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) Mm, 450 µL de buffer de succinato de sodio 20 Mm a un pH de 4, y 50 µL de ECE. Se empleó un blanco con todos los reactivos de reacción sustituyendo los 50 µL del MnSO₄ por 50µL de H₂O. Se mantuvo en incubación una hora a 40°C, para leerse a una longitud de onda de 610nm. (Torres-Hernández y cols. 2019).

6.2.7 Determinación de biomasa final

Para obtener la biomasa final del consorcio fúngico del sobrenadante se empleó papel Whatman No. 4 sobre una bomba de vacío para filtrar el sobrenadante y obtener la biomasa. A continuación, esta se sometió a un tratamiento de deshidratación en un horno a 50 °C durante 24 h hasta peso constante para su cuantificación por diferencia de peso seco (Ahuactzin-Pérez y cols. 2014).

7. RESULTADOS

7.1 Prueba de medios

La prueba de los medios GYE, Toyamas y Czapek sin y con la presencia de BFA en los hongos *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans*, se muestran en la Tabla 3 y la Tabla 4 respectivamente. Los hongos muestran crecimientos con diferencias significativas en los distintos medios. En la Figura 7 se muestran los porcentajes de inhibición de cada uno de los hongos en los tres medios diferentes en presencia de bisfenol-A.

7.1.1 Velocidades de crecimiento sin BFA

En la Tabla 3 se muestra la comparación de las velocidades de crecimiento de *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans* en tres medios diferentes. En el medio Toyamas se obtuvieron los valores más altos de 0.46, 0.49 y 0.40 en los hongos *A. niger* 321 *A. niger* SCB y *A. flavus* 1V, respetivamente. Se obtuvieron los valores más altos para *A. niger* Mn-P7 y *A. flavus* 2C en el medio Czapek de 0.50 y 0.45 respectivamente. Por último, en el medio GYE se

obtuvieron los valores más altos para *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans*, 0.29, 0.44, 0.46 y 0.45 respectivamente.

Tabla 3. Velocidad de crecimiento *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans*. En medio GYE, Czapek y Toyamas.

<i>Hongos</i>	<i>Medios de cultivo sin BFA</i>		
	GYE- SB	Czapek- SB	Toyamas- SB
<i>A. niger</i> 321	0.45 ^a ± 0.01	0.35 ^b ± 0.003	0.46 ^a ± 0.003
<i>A. niger</i> SCB	0.42 ^a ± 0.04	0.39 ^a ± 0.04	0.49 ^a ± 0.09
<i>A. niger</i> Mn-P7	0.39 ^b ± 0.04	0.50 ^a ± 0.08	0.47 ^a ± 0.01
<i>A. flavus</i> 1V	0.35 ^a ± 0	0.16 ^b ± 0.07	0.40 ^a ± 0.09
<i>A. flavus</i> 2C	0.38 ^{a,b} ± 0.04	0.45 ^a ± 0.08	0.33 ^b ± 0.04
<i>A. flavus</i> NRRL3357	0.29 ^a ± 0	0.18 ^c ± 0.01	0.21 ^{b,c} ± 0.03
<i>A. terreus</i>	0.44 ^a ± 0.02	0.43 ^a ± 0.03	0.19 ^b ± 0.03
<i>A. terreus</i> ATCC10029	0.46 ^a ± 0.07	0.22 ^b ± 0.01	0.25 ^b ± 0.05
<i>A. nidulans</i>	0.45 ^a ± 0.04	0.36 ^b ± 0.04	0.23 ^c ± 0.007

Se reporta el promedio ± la DS. de las medias. Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa (p<0.05)

1.2 Velocidades de crecimiento con BFA

En la Tabla 4 se muestra la comparación de las velocidades de crecimiento de *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans* en tres medios diferentes más 200mg/L de BFA. Las velocidades más altas se muestran en el medio Toyamas de 0.26, 0.26, 0.27, 0.20 y 0.19 para los hongos *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C respectivamente, teniendo diferencias significativas con los otros medios. Se obtuvieron los valores de 0.27 y 0.23 en el medio Czapek para los hongos *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029

respectivamente. Por último, se obtuvieron los valores más altos en el medio GYE de 0.14 y 0.20 para los hongos *A. flavus* NRRL3357 y *A. nidulans* respectivamente.

Tabla 4. Velocidad de crecimiento de *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y medio GYE, Czapek y Toyamas más 200mg/L de bisfenol-A.

<i>Hongos</i>	<i>Medios de cultivo con BFA</i>		
	GYE	Czapek	Toyamas
<i>A. niger</i> 321	0.17 ^b ± 0.03	0.19 ^b ± 0.007	0.26 ^a ± 0.03
<i>A. niger</i> SCB	0.14 ^b ± 0.03	0.13 ^b ± 0.03	0.26 ^a ± 0.003
<i>A. niger</i> Mn-P7	0.15 ^b ± 0.04	0.17 ^b ± 0.003	0.27 ^a ± 0.06
<i>A. flavus</i> 1V	0.23 ^a ± 0.03	0.16 ^b ± 0.07	0.20 ^{a,b} ± 0.06
<i>A. flavus</i> 2C	0.12 ^a ± 0.03	0.09 ^b ± 0.01	0.19 ^a ± 0.01
<i>A. flavus</i> NRRL3357	0.14 ^a ± 0.01	0.13 ^a ± 0.02	0.07 ^b ± 0.02
<i>A. terreus</i>	0.13 ^b ± 0.01	0.27 ^a ± 0.05	0.12 ^b ± 0.02
<i>A. terreus</i> ATCC10029	0.16 ^b ± 0.01	0.23 ^a ± 0.08	0.05 ^c ± 0.03
<i>A. nidulans</i>	0.20 ^a ± 0	0.16 ^{a,b} ± 0.01	0.13 ^b ± 0.01

Se reporta el promedio ± la DS. de las medias. Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa (p<0.05)

7.1.3 Porcentajes de inhibición

Con respecto a los porcentajes de inhibición de los hongos en medio GYE, Czapek y Toyamas a una concentración de 200 mg/L de BFA se muestra que el medio GYE tiene un porcentaje de inhibición mayor al 50% en 7 hongos (*A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 2C, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans*), el medio Czapek muestra, de igual manera, un porcentaje de inhibición mayor al 50% en 4 hongos (*A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 2C y *A. nidulans*) a diferencia del medio Toyamas que muestra solo 2 con porcentaje de inhibición

mayor al 50% (*A. flavus* NRRL3357 y *A. terreus* ATCC10029) y los 7 hongos restantes muestran porcentajes de inhibición por debajo del 50% (Figura 7).

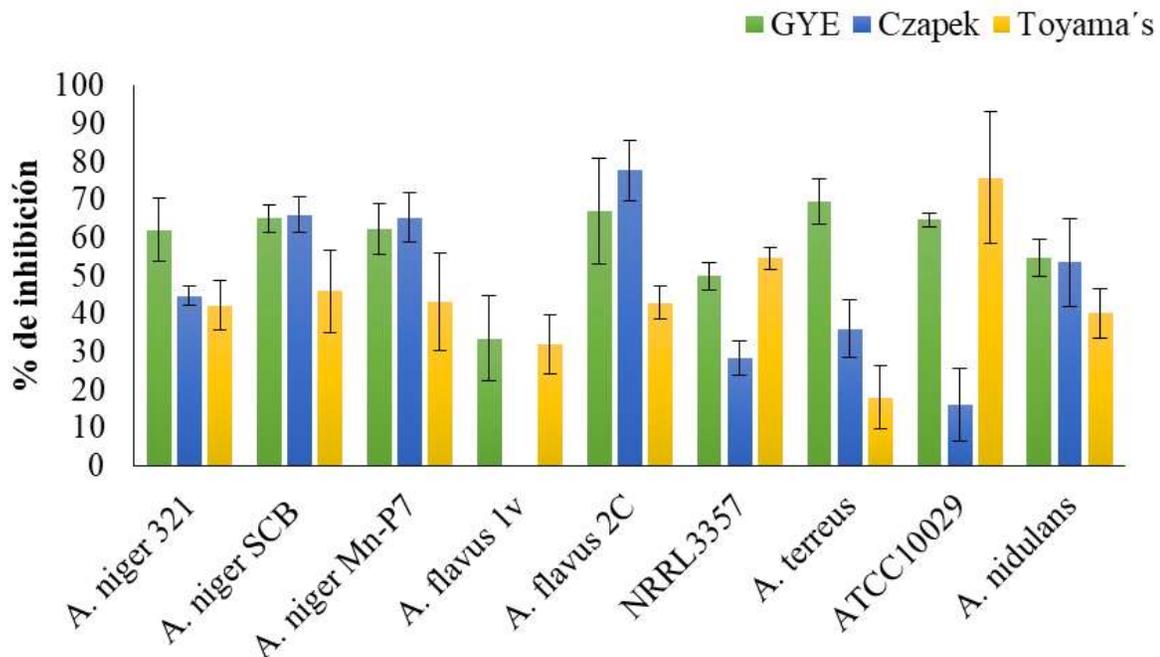


Figura 7. Porcentajes de inhibición de *A. niger* 321 *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P7, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. flavus* NRRL3357, *A. terreus*, *A. terreus* ATCC10029 y *A. nidulans* en medio GYE (■), Czapek (■) y Toyamas (■).

7.2 Prueba de tolerancia

7.2.1 Velocidad de crecimiento

Las concentraciones utilizadas para realizar la prueba de tolerancia fueron 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500ppm de BFA en medio Toyamas. Se obtuvo que la mayor velocidad de crecimiento fue en la concentración de 0ppm de BFA para la mayoría de los hongos, exceptuando *A. flavus* NRRL3357 y *A. terreus* que mostraron su mayor crecimiento en la concentración de 100ppm

200ppm respectivamente, se observa un patrón en la mayoría de los hongos, conforme aumenta la concentración de BFA disminuye el crecimiento de los hongos (Figura 8).

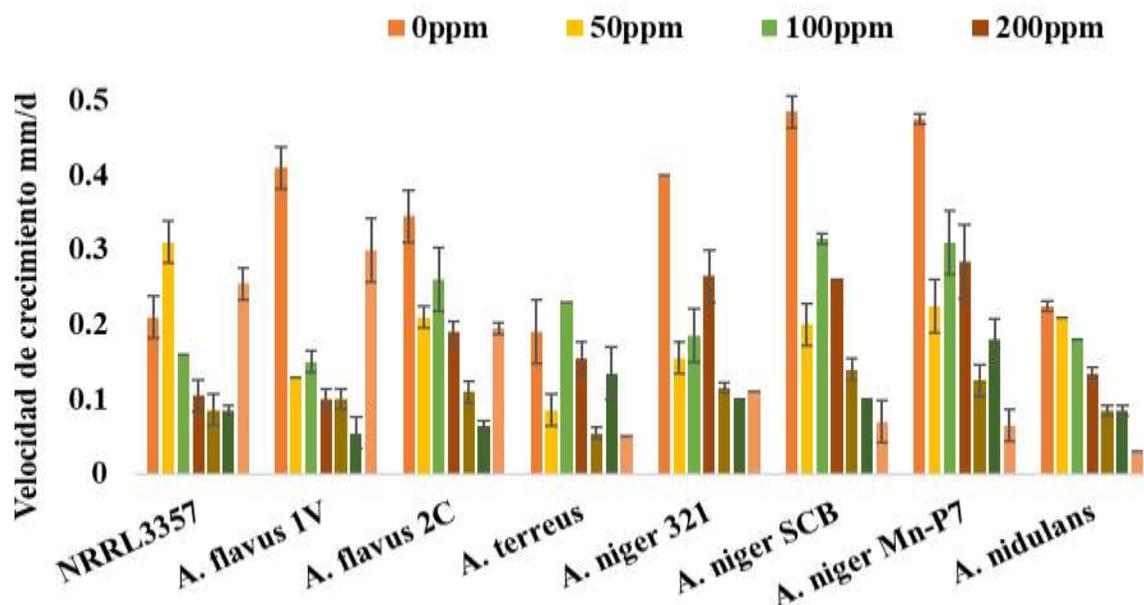


Figura 8. Velocidades de crecimiento de *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. terreus*, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP, *A. nidulans* en medio Toyamas adicionado con 0 (■), 50 (■), 100 (■), 200 (■), 300 (■), 400 (■) y 500 (■) ppm de BFA, respectivamente

7.2.2 Porcentaje de inhibición

Con los valores obtenidos en la velocidad de crecimiento se calculó el porcentaje de inhibición, convirtiendo las velocidades de crecimiento radial de cada hongo de las diferentes concentraciones en porcentaje (%), se consideró como 100% la velocidad en el medio sin la adición de BFA (0ppm). A continuación, al 100% se le restó el porcentaje correspondiente a cada velocidad de crecimiento, obteniendo de esta manera el porcentaje inhibitorio que cierta concentración de BFA causaba a los hongos. En la Figura 9 se muestran los porcentajes de inhibición de cada hongo en los 7 medios de BFA. Se puede observar que el único hongo que

muestra un porcentaje de inhibición de 0% en el medio adicionado con 50ppm de BFA es *A. flavus* NRRL3357 lo que nos lleva a sugerir que es uno de los hongos más adaptable al xenobiótico, a diferencia de *A. terreus* y *A. flavus* 2C que en esta misma concentración muestran un porcentaje de inhibición de 55% y 36% respectivamente, porcentajes altos para una concentración baja. La concentración de 100ppm de BFA nos muestra porcentajes de inhibición por debajo del 50% en la mayoría de los hongos, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP y *A. nidulans* con valores de 23%, 41%, 21%, 29%, 34% y 19% respectivamente, por lo que esta concentración está en los parámetros para el crecimiento ideal de los hongos ya mencionados. Conforme se aumentó la concentración de BFA se incrementó el porcentaje de inhibición, en la concentración de 200ppm de BFA se muestran porcentajes de 62% en *A. flavus* 2C y 67% en *A. terreus* a diferencia del resto de los hongos que se mantienen en el rango de 40-50% de inhibición en esta concentración.

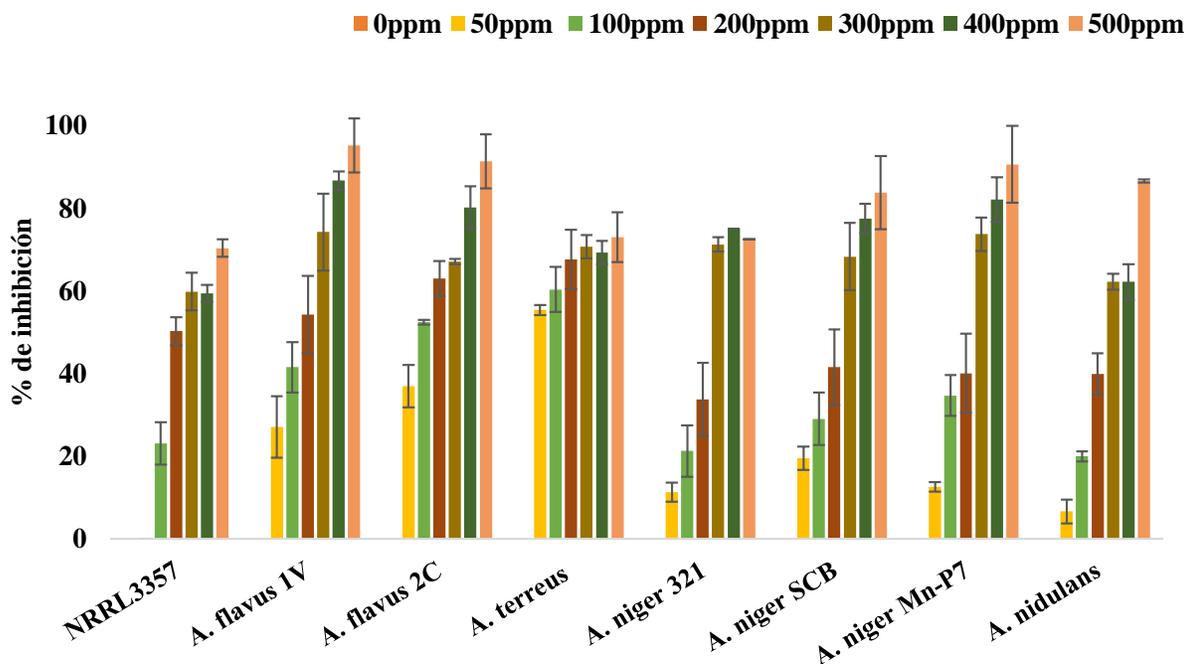


Figura 9. Porcentajes de inhibición de *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. terreus*, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP, *A. nidulans* en medio Toyamas adicionado con 0 (), 50 (), 100 (), 200 (), 300 (), 400 () y 500 () ppm de BFA, respectivamente.

En la concentración de 300ppm de BFA quienes muestran los porcentajes más bajos son *A. flavus* NRRL3357 con 59% y *A. nidulans* con 62% de inhibición en contraste con *A. niger* Mn-P y *A. flavus* 1V que muestran los valores más altos con 73% y 74% respectivamente. Posteriormente observamos que *A. flavus* NRRL3357 y *A. nidulans* se mantienen con los mismos porcentajes de inhibición en la concentración de 300 y 400ppm en comparación del resto, especialmente con *A. flavus* 2C donde su porcentaje de inhibición es el mayor con el 80%. Por último, en la concentración de 500ppm de BFA tenemos porcentajes de 95%, 91% y 90% de los hongos *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C y *A. niger* MnP respectivamente y un porcentaje bajo de 70% de *A. flavus* NRRL3357. El aumento de los porcentajes de inhibición es proporcional al aumento de BFA en los hongos, para la formación del consorcio se requieren hongos que crezcan a la misma, o similar, velocidad radial para poder tener una relación de sinergia óptima por lo que se excluyen los hongos *A. terreus* y *A. flavus* 2C, debido a que su crecimiento es significativamente más lento que el del resto de los hongos.

Sabemos por el análisis comparativo sobre los promedios de los porcentajes de inhibición de cada uno de los hongos en las diferentes concentraciones, que todos los medios sin adición de BFA nos muestra porcentajes con el 0% de inhibición ya que fueron tomados como el 100% de porcentaje de crecimiento. En la Tabla 5 podemos observar que *A. flavus* NRRL3357 tiene un porcentaje de inhibición de 0% con diferencia significativa en el medio con la adición de 50ppm de BFA, por otro lado, en la concentración de 100ppm de BFA el porcentaje de inhibición más bajo fue de 19.96% por *A. nidulans*. Posteriormente la concentración de 200ppm de BFA mostro su porcentaje de inhibición más bajo por *A. niger* SCB con un porcentaje de 33.75% y por último en las concentraciones de 300, 400 y 500ppm de BFA *A. flavus* NRRL3357 mostró los porcentajes más bajos con 59.83%, 59.38% y 70.32% respectivamente. Se muestra también que la mayoría de los hongos (*A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP y *A. nidulans*) son capaces de crecer de manera óptima en una concentración de 200ppm de BFA ya que muestran un rango de 33% a 54% de inhibición en esta concentración y los porcentajes de inhibición de los 2 hongos restantes (*A. terreus* y *A. flavus* 2C) en esta concentración tienen diferencias significativas por lo que se establece la concentración de 200ppm para los experimentos posteriores debido a la velocidad de crecimiento ideal que tienen los hongos en este medio y la eliminación de 2 hongos por la lenta velocidad de crecimiento.

Tabla 5. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. flavus* 2C, *A. terreus*, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP, *A. nidulans* en medio Toyamas adicionado con 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500ppm de BFA .

<i>Hongos</i>	<i>Concentraciones de BFA</i>						
	0	50	100	200	300	400	500
<i>A. flavus</i> NRRL3357	0 ^{a1} ± 0	0 ^{a1} ± 0	23.11 ^{b1,2} ± 5.1	50.22 ^{c3} ± 3.39	59.83 ^{d1} ± 4.6	59.38 ^{d1} ± 2.10	70.32 ^{e1} ± 2.13
<i>A. flavus</i> 1V	0 ^{a1} ± 0	27.05 ^{b5} ± 7.47	41.5 ^{c4} ± 6.1	54.24 ^{d3} ± 9.33	74.24 ^{e2} ± 9.33	86.67 ^{f5} ± 2.21	95.18 ^{g4} ± 6.50
<i>A. flavus</i> 2C	0 ^{a1} ± 0	36.93 ^{b6} ± 5.09	52.4 ^{c5} ± 0.6	62.97 ^{c,d4} ± 4.20	67.11 ^{d2} ± 0.63	80.22 ^{e4} ± 5.03	91.30 ^{f3,4} ± 6.56
<i>A. terreus</i>	0 ^{a1} ± 0	55.39 ^{b7} ± 1.20	60.34 ^{b6} ± 5.41	67.61 ^{b,c4} ± 7.23	70.73 ^{c,d2} ± 2.81	69.26 ^{c,d2,} 3 ± 2.81	73.01 ^{d1} ± 6.02
<i>A. niger</i> 321	0 ^{a1} ± 0	11.25 ^{b3} ± 2.30	21.25 ^{c1} ± 6.18	33.75 ^{d1} ± 8.83	71.25 ^{d2} ± 1.76	75 ^{d3} ± 0	72.5 ^{d1} ± 0
<i>A. niger</i> SCB	0 ^{a1} ± 0	19.5 ^{b4} ± 2.77	29 ^{c2,3} ± 6.36	41.5 ^{d2} ± 9.19	68.28 ^{e2} ± 8.13	77.5 ^{e,f,3,4} ± 3.53	83.75 ^{f2} ± 8.83
<i>A. niger</i> Mn-P7	0 ^{a1} ± 0	12.57 ^{b3} ± 1.14	34.66 ^{c3} ± 4.95	40.07 ^{c2} ± 9.52	73.71 ^{d2} ± 4.07	82.14 ^{d,e,4,} 5 ± 5.39	90.60 ^{e3,4} ± 10.28
<i>A. nidulans</i>	0 ^{a1} ± 0	6.62 ^{b2} ± 2.93	19.96 ^{c1} ± 1.25	39.92 ^{d2} ± 5.03	62.25 ^{e,1,2} ± 1.95	62.15 ^{e,1} ± 4.33	86.60 ^{f,2,3} ± 0.41

Se reporta el promedio ± DS. de las medias. Medias con diferente letra (a, b, c, d, e, f, g) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones en el mismo hongo. Medias con numero diferente (1, 2, 3, 4, 5, 6) muestran una diferencia significativa entre especies de hongos con la misma concentración.

7.3 Prueba de antagonismo

Los hongos que se utilizaron en la prueba de antagonismo fueron *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP, *A. nidulans*. El medio utilizado fue el medio Toyamas en ausencia y presencia de 200ppm de BFA.

7.3.1 Prueba de antagonismo sin BFA

En la Figura 10 podemos observar las imágenes de la evaluación antagónica en ausencia de BFA, así como cada una de las interacciones que mostraron todos los hongos al actuar como desafiados y desafiante, así como el orden de sembrado que tuvo cada uno de ellos. El hongo 1 (*A. niger* 321) como desafiante mostró tres interacciones mutualistas, una antagonista y una de comensalismo con los hongos 2, 3, 5, 4 y 6 respectivamente. En el hongo 2 (*A. niger* SCB) se observaron dos interacciones mutualistas, dos de comensalismo y una de agonismo con los hongos 1, 3, 5, 6 y 4 respectivamente. En el hongo 3 (*A. niger* Mn-P) observamos tres interacciones mutualistas con los hongos 1, 2 y 5, y es el primero en mostrar dos interacciones de co-habitación en los hongos 4 y 6. Por otro lado el hongo 4 (*A. nidulans*) nos mostró tres interacciones de co-habitación con los hongos 1, 3 y 5. El hongo 5 (*A. flavus* NRRL3357) mostró una interacción de co-habitación con el hongo 4, una interacción agonista con el hongo 6, una interacción comensalista con el hongo 2 y ds interacciones mutualistas con los hongos 1 y 3. Por último, el hongo 6 (*A. flavus* 1V) mostró 3 interacciones de co-habitación con los hongos 2, 4 y 5, y 2 mutualistas iguales al hongo 5. Se evaluó cada interacción para poder obtener el porcentaje de antagonismo.

A continuación, se muestran (Tabla 6) los porcentajes de antagonismo de los 6 hongos en ausencia de BFA. El porcentaje antagónico más alto lo obtuvo el hongo 6 (*A. flavus* 1V) con un valor de 93.3%, seguido del hongo 4 (*A. nidulans*) con un valor total de 88.8%. El hongo 5 presentó un valor de 50%, seguido del hongo 3 con un %38.8 y por último los hongos 1 y 2 con un 26.6% de antagonismo. Estos dos hongos rebasaron el 50% de antagonismo en la prueba lo que sugiere la eliminación de ellos del consorcio fúngico, los hongos restantes (*A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P, *A. flavus* NRRL3357) estuvieron en el rango y debajo de este valor lo que indica su baja incidencia en el antagonismo de los otros hongos.

Prueba antagónica sin BFA

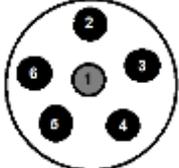
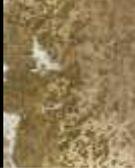
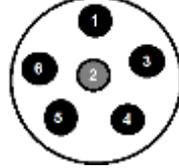
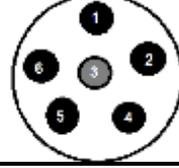
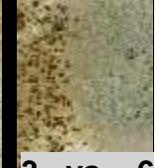
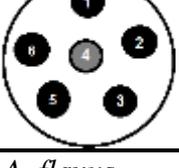
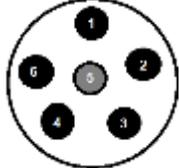
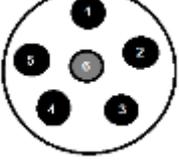
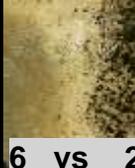
Hongos desafiados	<u>Interacciones</u>					
<p>1. <i>A. niger</i> 321</p> 		 1 vs 2	 1 vs 3	 1 vs 4	 1 vs 5	 1 vs 6
<p>2. <i>A. niger</i> SCB</p> 		 2 vs 1	 2 vs 3	 2 vs 4	 2 vs 5	 2 vs 6
<p>3. <i>A. niger</i> Mn-P</p> 		 3 vs 1	 3 vs 2	 3 vs 4	 3 vs 5	 3 vs 6
<p>4. <i>A. nidulans</i></p> 		 4 vs 1	 4 vs 2	 4 vs 3	 4 vs 5	 4 vs 6
<p>5. <i>A. flavus</i> NRRL3357</p> 		 5 vs 1	 5 vs 2	 5 vs 3	 5 vs 4	 5 vs 6
<p>6. <i>A. flavus</i> 1V</p> 		 6 vs 1	 6 vs 2	 6 vs 3	 6 vs 4	 6 vs 5

Figura 10. Evaluación antagónica en ausencia de BFA de los hongos *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP A, *A. nidulans*, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V

Tabla 6. Porcentaje de antagonismo en ausencia de BFA de los hongos *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP A, *A. nidulans*, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V

Porcentajes de antagonismo sin BFA												
Desafiada	Desafiantes						SDE P	LD	LI	X2	X1	%A
	1	2	3	4	5	6						
1	-	0	0	8	0	2	1.6	0	0	1.6	6	26.6
2	0	-	0	6	2	2	1.6	0	0	1.6	6	26.6
3	0	0	-	4	0	4	1.33	0	2	2.33	6	38.8
4	4	0	4	-	4	2	2.33	4	2	5.33	6	88.8
5	0	2	0	6	-	4	2	2	0	3	6	50
6	2	4	2	4	4	-	2.6	2	4	5.6	6	93.3

7.3.3 Prueba de antagonismo con BFA

Esta prueba antagónica con la adición de 200ppm de BFA mostró un patrón similar a la prueba en ausencia de BFA. El hongo 1 mostró dos interacciones mutualistas con los hongos 2 y 3, una interacción comensalista, una de co-habitación y una agonista con los hongos 5, 4 y 6 respectivamente. El hongo 2 mostró tres interacciones mutualistas con los hongos 1, 2 y 5, así como una interacción antagonista con el hongo 4 y una interacción agonista con el hongo 6. Observamos tres interacciones mutualistas en el hongo 3 con los hongos 1, 2 y 5, así como una de cohabitación y una agonista con los hongos 4 y 6 respectivamente. En el hongo 4 obtuvimos tres interacciones comensalistas con los hongos 1, 2 y 5, también una de co-habitación y una agonista con los hongos 3 y 6. En el hongo 5 observamos tres interacciones mutualistas con los primeros hongos, una co-habitación y agonista con los hongos 4 y 6. Por último, el hongo 6 mostró una interacción mutualista con el hongo 3, dos interacciones de co-habitación con los hongos 1 y 5, y una interacción antagónica con el hongo 4 (Figura 11).

A continuación, se muestran (Tabla 7) los porcentajes de antagonismo de los 6 hongos en presencia de 200ppm BFA con base en las interacciones mostradas en la figura 9.

El porcentaje antagónico más alto lo obtuvieron los hongos 4 y 6 (*A. nidulans* y *A. flavus* 1V) con un 94.4% de antagonismo con respecto a los hongos restantes. Abajo del 50% de antagonismo se encuentran los hongos 3 y 5 (*A. niger* Mn-P y *A. flavus* NRRL3357) con el 44.4% y los hongos 1 y 2 (*A. niger* 321 y *A. niger* SCB) con el 33.3% y 38.8% respectivamente.

Prueba antagónica con BFA

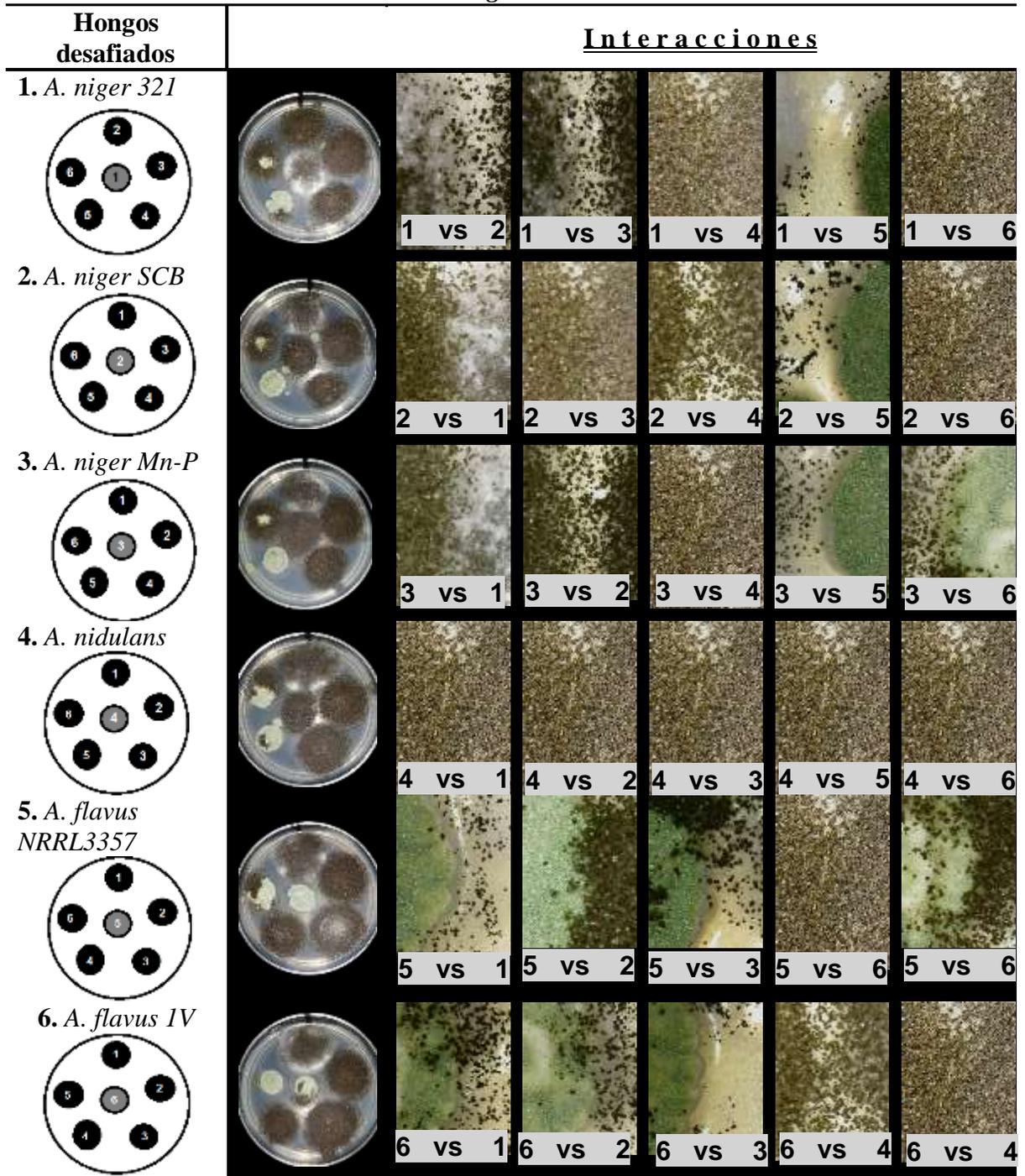


Figura 11. Evaluación antagónica en presencia de 200ppm de BFA de los hongos *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP A, *A. nidulans*, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V.

Tabla 7. Porcentaje de antagonismo en presencia de 200ppm de BFA de los hongos *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP A, *A. nidulans*, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V.

Porcentajes de antagonismo con BFA													
Desafiada	Desafiantes						SDE P	LD	LI	X2	XI	%A	
	1	2	3	4	5	6							
1	-	0	0	4	2	6	2	0	0	2	6	33.3	
2	0	-	0	8	0	6	2.3	0	0	2.3	6	38.8	
3	0	0	-	4	0	6	1.6	0	2	2.6	6	44.4	
4	2	2	4	-	2	6	2.6	2	4	5.6	6	94.4	
5	0	0	0	6	-	4	1.6	2	0	2.6	6	44.4	
6	4	6	0	8	4	-	3.6	2	2	5.6	6	94.4	

7.4 Cinética de crecimiento del consorcio fúngico

Los hongos que conformaron el consorcio fúngico durante la fermentación sumergida fueron *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* MnP y *A. flavus* NRRL3357. A continuación, se muestran los resultados obtenidos de cada una de las variables evaluadas durante los 12 días de la fermentación.

7.4.1 Producción instantánea de dióxido de carbono

En la Figura 12 observamos la producción de CO₂ durante la fermentación sumergida, el tratamiento que contiene medio Toyamas y el consorcio fúngico (1) nos muestra un incremento en el CO₂ en el día 2 que se mantiene con pocas diferencias hasta el día 6 de la fermentación en donde se observa la menor producción de CO₂ durante 2 días consecutivos con valores de 1.06 y 0.99 mg/L, a continuación, se puede observar su mayor producción en el día 9 con un valor de 12.48 mg/L. Por otro lado, se observa en el tratamiento con 200ppm de BFA, el medio de cultivo y el consorcio fúngico (2) un incremento exponencial desde el día 0 hasta el día 3 en donde tiene su mayor producción de CO₂ con un valor de 10.22 mg/L, teniendo sus menores valores de producción el día 5 y 6 con valores de 1.45 y 1.06 mg/L respectivamente, al final,

tiene un último pico de alta producción en el día 9 con un valor de 8.08 mg/L. El tratamiento que solo contiene medio Toyamas y el que contiene medio de cultivo más 200ppm de BFA no muestran producción de CO₂ durante los 12 días de la fermentación.

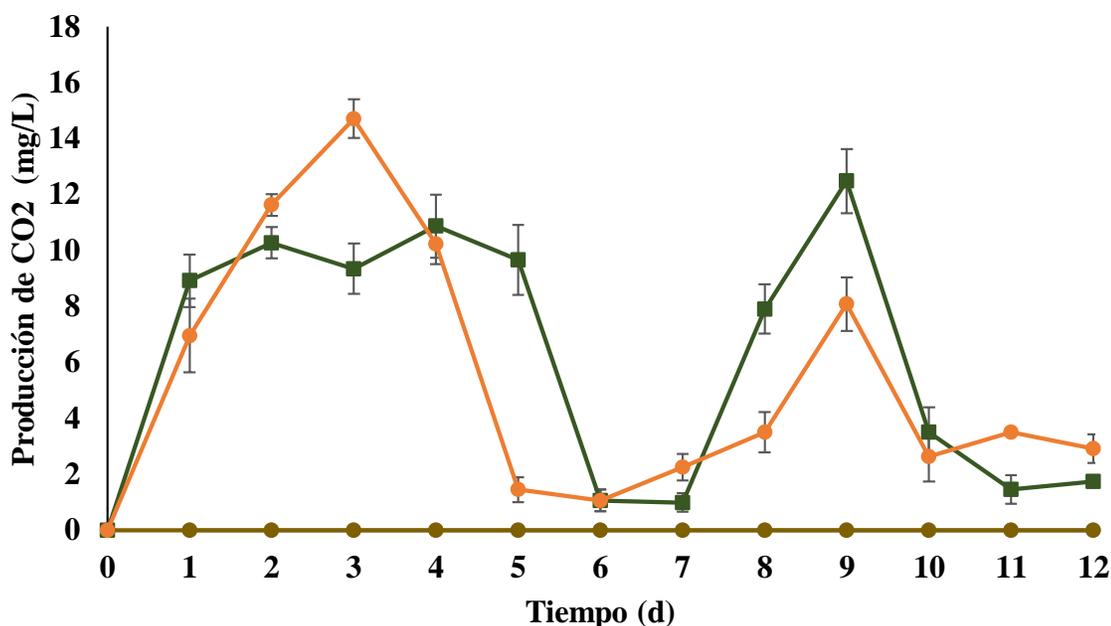


Figura 12. Producción de CO₂ (mg/L) del consorcio fúngico de *Aspergillus* con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida.

A continuación, se presentan los parámetros cinéticos de producción de CO₂ (X) con la aplicación del modelo matemático, el valor más alto de μ fue en el tratamiento que contiene 200ppm de BFA, medio Toyamas y el consorcio fúngico (2) con 0.5969 h^{-1} siendo esta significativamente diferente con respecto a los otros 3 tratamientos ($P < 0.05$), seguido del tratamiento con medio Toyamas y el consorcio fúngico obteniendo un valor de 0.4408 h^{-1} que mostró de igual manera una diferencia significativa con los otros 3 tratamientos ($P < 0.05$). Los tratamientos restantes muestran valores de 0 debido a los resultados obtenidos con anterioridad.

Con respecto a los parámetros de $X_{\text{máx}}$ y del $Y_{X/S}$, los mayores valores se encuentran en el tratamiento que contiene el consorcio fúngico y el medio de cultivo Toyamas (1), con 79.359

g/L y 8.3520 gX/gS respectivamente, siendo significativamente diferente ($P < 0.05$) a los otros 3 tratamientos. Los valores máximos cuando al tratamiento se le adicionó BFA (2), fueron de 63.920 g/L en para X_{\max} y 6.2667 gX/gS para el $Y_{x/s}$ siendo ambos valores significativamente diferentes de los otros tratamientos ($P < 0.05$). Por último, los dos tratamientos restantes nos muestran valores de 0 (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros cinéticos de producción de CO_2 del consorcio fúngico de *Aspergillus* con cuatro distintos tratamientos en fermentación sumergida.

Parámetro	Tratamientos			
	T 1	T 2	T 3	T 4
μ (h^{-1})	$0.4408^b \pm 0.01$	$0.5969^a \pm 0.07$	0^c	0^c
X_{\max} (g/L)	$79.359^a \pm 3.64$	$63.920^b \pm 2.33$	0^c	0^c
Y (X/S) (gx/gS)	$8.3520^a \pm 0.36$	$6.2667^b \pm 0.22$	0^c	0^c

Se reporta el promedio \pm DS. de las medias. Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

7.4.2 Producción de CO₂ acumulado

En la Figura 13 se muestra el CO₂ acumulado con respecto al tiempo durante toda la fermentación sumergida.

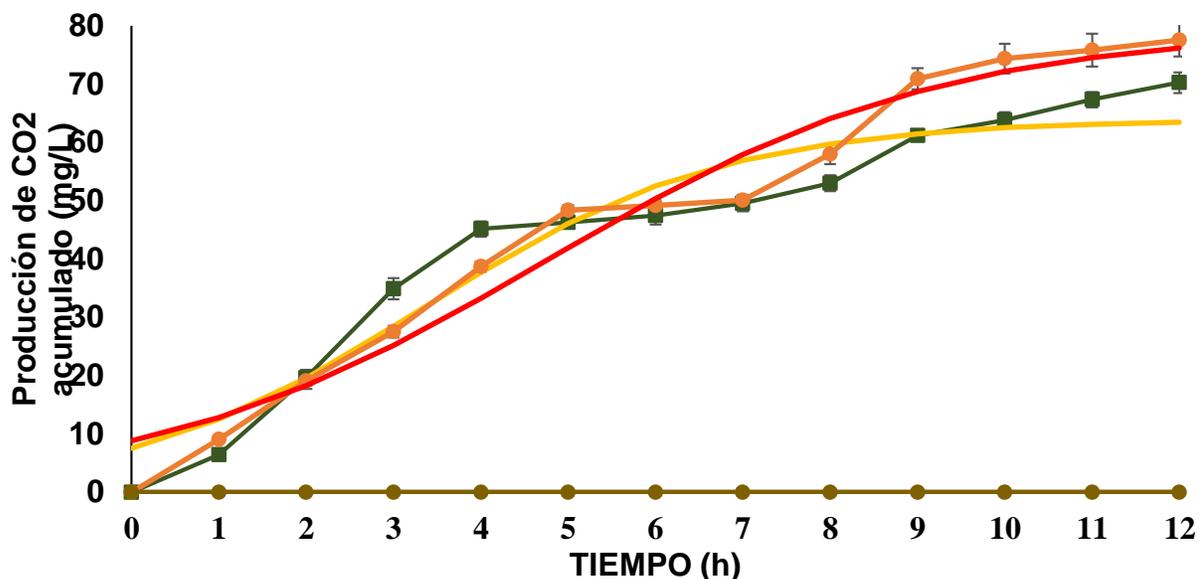


Figura 13. Producción de CO₂ acumulado (mg/L) del consorcio fúngico de *Aspergillus* con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆), y CO₂ calculado del tratamiento 1 (■) y 2 (●) crecido en fermentación sumergida.

El tratamiento con medio Toyamas y el consorcio fúngico (1) podemos observar 3 fases de producción, una fase de adaptación, un fase exponencial y una fase estacionaria en donde la producción dejó de aumentar, se reporta un acumulado total de 70.25 mg/L de dióxido de carbono en donde el CO₂ cal, que corresponde al ajuste normalizado del modelo matemático de la ecuación logística, se ajusta de manera correcta a los datos obtenidos durante los 12 días.

El tratamiento positivo que contiene 200ppm de BFA, medio Toyamas y el consorcio fúngico (2) muestra de forma más pronunciada las tres fases antes mencionadas en la producción de CO₂, este tratamiento reporta un acumulado total de 77.58 mg/L de CO₂ durante los 12 días de la fermentación en donde, de igual forma, el CO₂ cal se ajusta de manera correcta a todos los datos Este tratamiento se mantuvo en un rango más alto de producción en comparación con el primer tratamiento. Los tratamientos con el medio Toyamas y 200ppm de BFA (3) y el medio que solo contiene medio Toyamas (4) muestran un acumulado total de 0 mg/L.

7.4.3 pH de la fermentación sumergida

Con respecto al pH de los matraces sacrificados durante la fermentación líquida (Figura 14), en el tratamiento 1 que contiene el consorcio y medio Toyamas, observamos un pH inicial de 5, este tuvo un descenso en los dos días siguientes hasta llegar a un pH de 2.5 en el día 2, manteniéndose con ligeros cambios hasta el día 12 con este mismo pH. El tratamiento 2 que contiene 200ppm de BFA, el consorcio fúngico y el medio Toyamas, nos muestra el mismo pH inicial y un comportamiento similar al tratamiento 1 hasta el final de la fermentación, aunque con un descenso más pronunciado en el día uno con un pH DE 3. Por otro lado, los valores de pH en el tratamiento 3 que contiene medio Toyamas y 200ppm de BFA, mostraron un incremento en el día 1 con un pH de 5.5, sin embargo en el día 2 tiene un descenso a un pH de 4.7 que continúa disminuyendo hasta tener un pH final de 4 en el día 12. Algo similar ocurre en el tratamiento 4 que únicamente contiene el medio Toyamas, presenta el mismo pH inicial que el resto de los tratamientos, con un incremento de 5.5 en el día 1 y a continuación con un descenso en el día 2 con un pH de 4.5, manteniéndose con ligeros cambios hasta el PH final de 4 en el día 12.

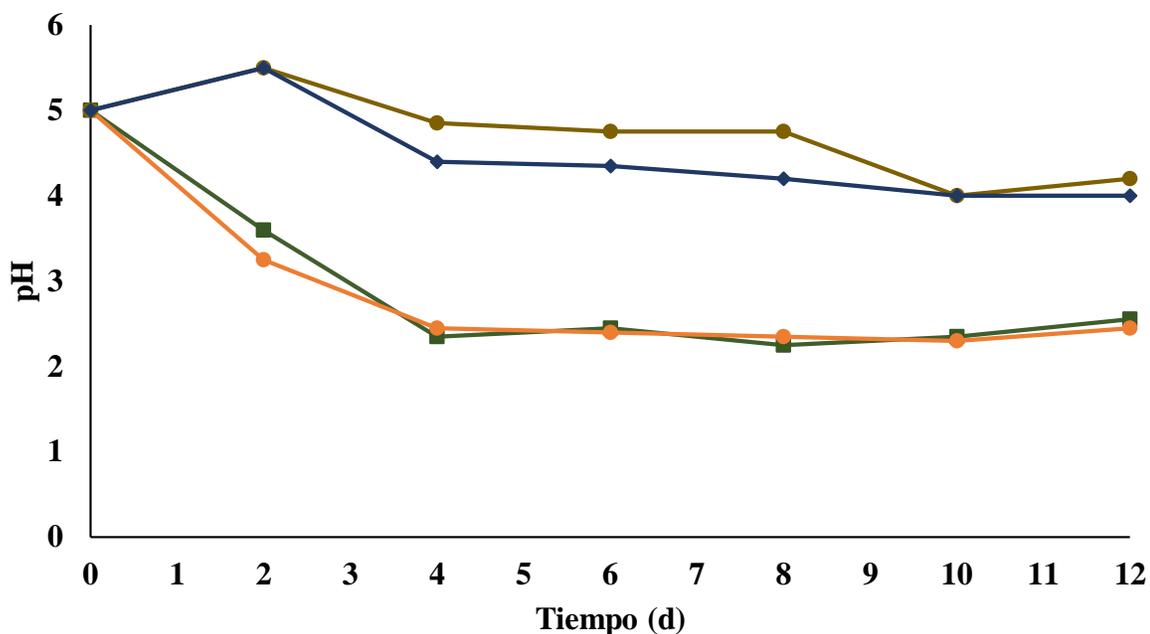


Figura. 14. Perfiles de pH del consorcio fúngico de *Aspergillus* con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida

7.4.4 Consumo de azúcares

El consumo de azúcares totales en cada uno de los tratamientos se muestra en la Figura 15. El tratamiento que contiene el medio Toyamas y el consorcio fúngico (1) después de 4 días transcurridos de la fermentación muestra un aumento en el consumo de glucosa dejando al tratamiento con aproximadamente la mitad de glucosa inicial, mostrando su mayor consumo de glucosa en el día 8. El tratamiento positivo que contiene 200ppm de BFA, el medio Toyamas y el consorcio fúngico de *Aspergillus* (2) muestra un descenso desde el día 1 hasta el día 12, en donde se puede observar la disminución más rápida de glucosa en el día 4 y teniendo el valor más alto de consumo en el día 12. Por otro lado, el tratamiento 3 y 4 se mantienen en 10 U/L de glucosa durante toda la fermentación.

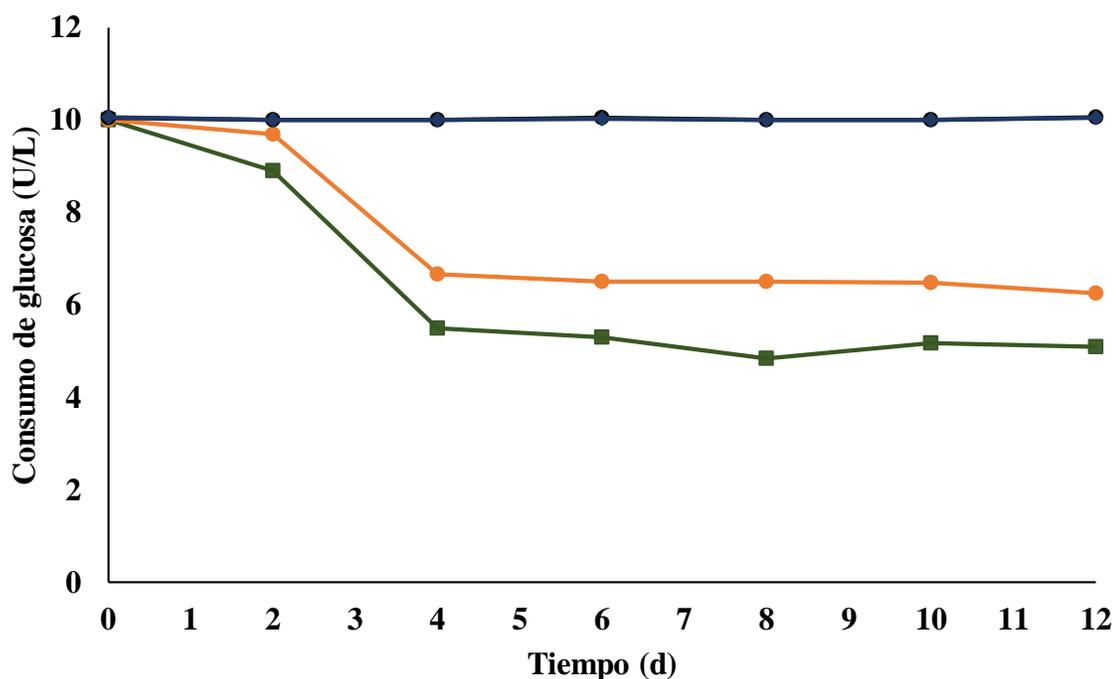


Figura 15. Consumo de glucosa del consorcio fúngico de *Aspergillus* con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida

7.4.5 Producción de lacasas

La actividad enzimática de lacasas producidas por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con los 4 tratamientos se muestra en la Figura 16. La mayor producción de enzimas lacasas se mostró en el tratamiento que solo contiene medio Toyamas y el consorcio fúngico (1) con un valor de 108.86 U/L una vez transcurridos los 8 días de la fermentación y su menor producción de actividad enzimática la presenta en el día 2 con un valor de 74.76 U/L, durante toda la fermentación presentó un incremento en la producción terminando con un valor de 163.27 U/L. El tratamiento positivo que contiene 200ppm de BFA, medio Toyamas y el consorcio fúngico (2) durante la fermentación mostró un crecimiento durante el día 2, sin embargo, tuvo una disminución de producción del día 4 al 6 en donde se observó la menor producción enzimática con un valor de 60.94 U/L, continuando con un aumento en el día 8 mostrando su mayor producción enzimática con un valor de 121.12 U/L, por último, con un valor de 119.84 U/L en el día 12.

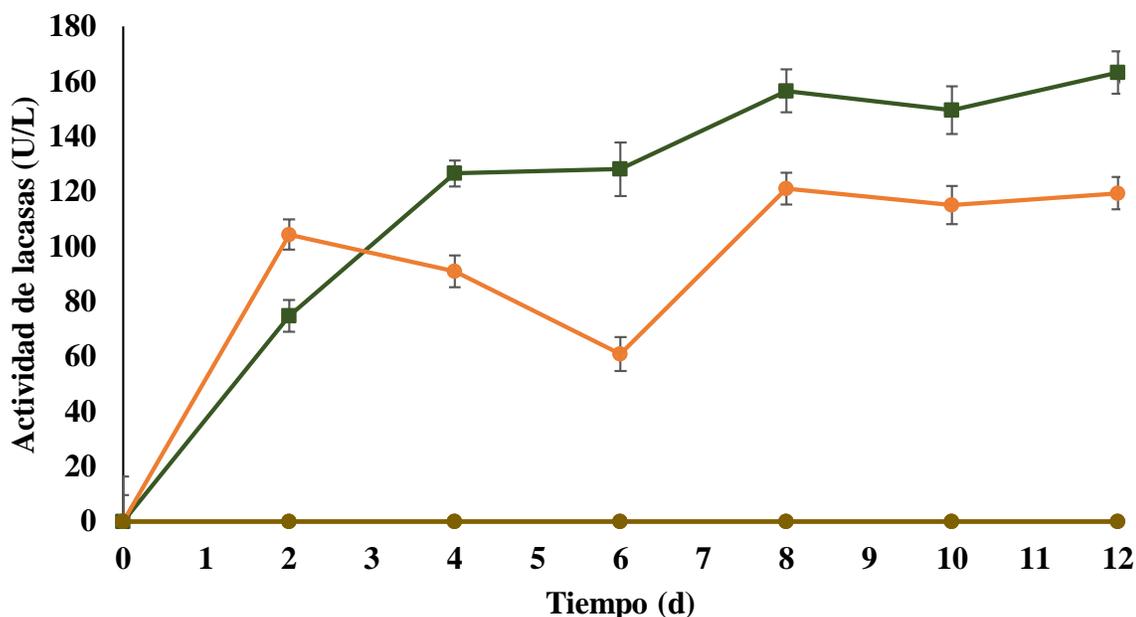


Figura 16. Actividad enzimática de lacasas del consorcio fúngico de *Aspergillus* con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida.

Con base en el análisis estadístico realizado entre los tratamientos para la variable evaluada de enzima máxima podemos observar en la Tabla 9 que el tratamiento con la adición del medio de cultivo Toyamas y el consorcio fúngico (1) mostró la mayor producción de Enzimas máxima durante la fermentación con un valor de 168.11 U/L que es significativamente diferente ($p < 0.05$) a los valores obtenidos en los otros tratamientos. Por otro lado, el valor de producción del tratamiento con 200ppm de BFA, medio Toyamas y el consorcio fúngico mostró su producción máxima con un valor de 127.97 U/L que, de la misma forma es significativamente diferente a los valores de los otros tratamientos.

Tabla 9. Parámetro cinético de producción enzimática máxima de lacasas por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con cuatro distintos tratamientos en fermentación sumergida.

Parámetro	Tratamientos			
	1	2	3	4
$E_{\text{máx}}$ (U/L) Lacasas	$168.11^a \pm 8.39$	$127.92^b \pm 6.76$	0^c	0^c

Se reporta el promedio \pm DS. de las medias. Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

7.4.6 Producción de Mn-P

En la Figura 17 se presenta la actividad enzimática de Mn-P producida por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con los 4 tratamientos distintos. El tratamiento con el medio Toyamas y el consorcio fúngico (1) muestra su mayor actividad de 108.86 U/L de Mn-P en el día 12 de la fermentación y la menor en el día 4 con una actividad de 22.95 U/L de Mn-P, encontrándose los primeros 7 días de la fermentación por debajo de la actividad encontrada en el tratamiento que contiene 200ppm de BFA, el medio Toyamas y en consorcio fúngico (2), éste muestra su menor actividad la presenta en el día 10 con 30.68 U/L de Mn-P y la mayor, al igual que el tratamiento 1 se presentó transcurridos los 12 días de la fermentación con una actividad de 104.09 U/L de Mn-P. Los tratamientos con el medio Toyamas y el BFA (3) y el que contiene solamente el medio de cultivo mostraron una actividad enzimática de 0 durante los 12 días de la fermentación.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la producción máxima de la enzima Mn-P con base en el análisis estadístico para evaluar la $E_{\text{máx}}$ de Mn-P, el valor máximo lo obtuvo el tratamiento que contiene el consorcio fúngico y el medio Toyamas (1) con un valor de 141.81

U/L mostrando una diferencia significativa en comparación con los tratamientos restantes. Por otra parte, el tratamiento positivo que contiene 200ppm de BFA, medio Toyamas y el consorcio fúngico mostro una producción máxima de Mn-P de 104.09 U/L significativamente diferente al resto de los tratamientos

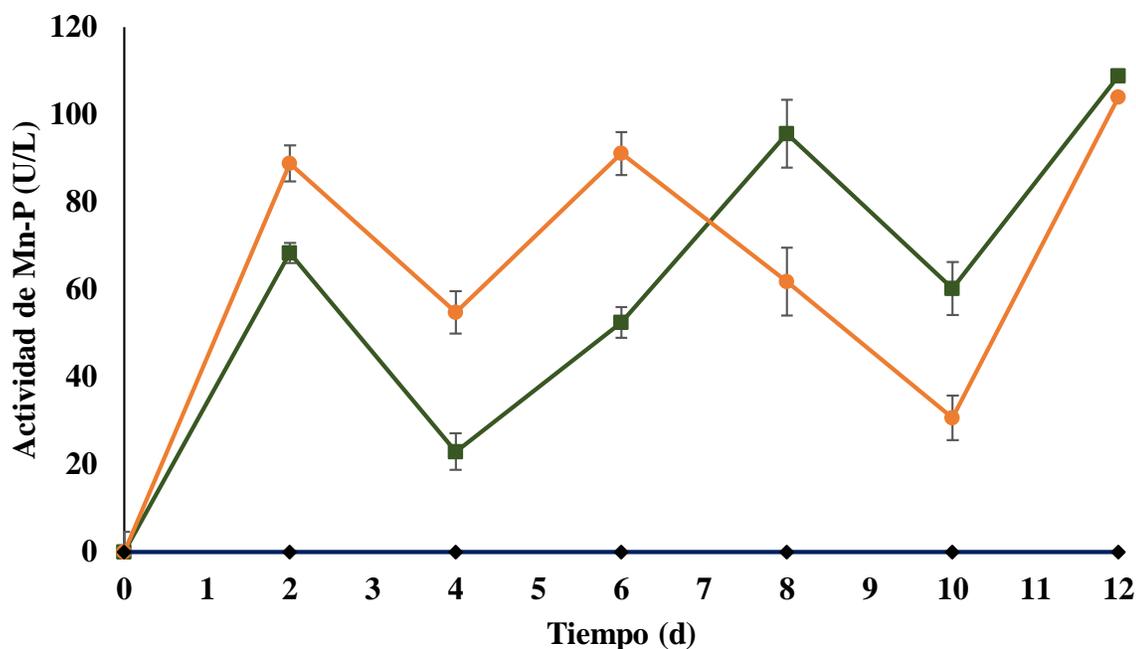


Figura 17. Actividad enzimática de Mn-P del consorcio fúngico de *Aspergillus* con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida

Tabla 10. Parámetro cinético de producción enzimática máxima de Mn-P por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con cuatro distintos tratamientos en fermentación sumergida.

Parámetro	Tratamientos			
	1	2	3	4
E_{\max} (U/L) Mn.P	$141.81^a \pm 11.23$	$104.09^b \pm 5.06$	0^c	0^c

Se reporta la $E_{\max} \pm$ desviación estándar. E_{\max} con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

7.4.7 Producción de biomasa

En la Figura 18 se presenta la producción de biomasa por el consorcio de *Aspergillus* en los distintos tratamientos durante los 12 días la fermentación sumergida.

En el tratamiento que contenía el medio Toyamas y el consorcio fúngico (1) se muestra un aumento de la biomasa obtenida desde el día 2 con un valor de 2.301 g/L, siendo este el menor valor, hasta el día 10 con un valor de 2.863 g/L, este fue el valor más alto del tratamiento, creciendo de forma exponencial y constante y terminando con una disminución de la biomasa con un valor de 2.468 g/L. Por otro lado, el tratamiento que contiene 200ppm de BFA, el medio Toyamas y el consorcio fúngico (2) presenta una producción de biomasa con poca diferencia entre los primeros días siendo más lenta que el tratamiento 1 por la adición de BFA, ya que muestra su menor valor durante el día 8 con un valor de 2.33 g/L, continuando con un aumento en el día 10 y el día 12 en donde mostró su mayor producción con un valor de 4.117 g/L. El tratamiento que contiene BFA y medio de cultivo (3), así como el que tiene solamente el medio de cultivo (4) no muestran producción de biomasa.

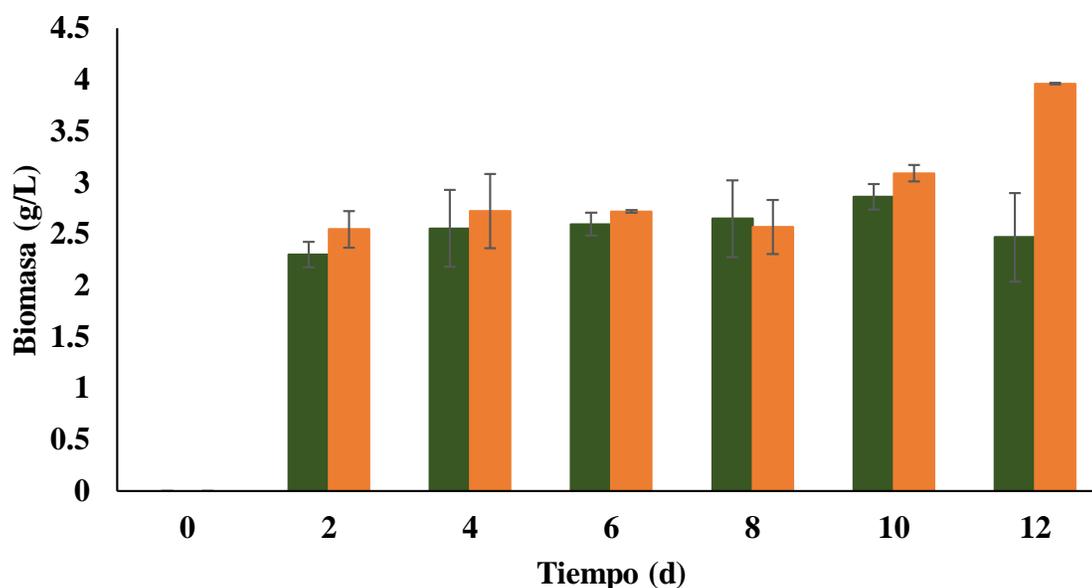


Figura 18. Crecimiento del consorcio fúngico con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 y 4 crecido en fermentación sumergida

8. DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos que el medio Toyamas es el óptimo para el crecimiento de hongos debido al porcentaje de inhibición menor al 50% con la adición de BFA. La prueba de tolerancia arrojó que la concentración idónea máxima tolerable es de 200ppm de BFA, en la que todos los hongos tienen una velocidad de crecimiento similar. Por otra parte, la prueba de antagonismo, sin la adición de BFA, muestra interacciones positivas en la mayoría de los hongos, sin embargo, al adicionar las 200ppm de BFA cambian de forma radical todas las ellas. En particular, solo 4 hongos (*A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* y *A. flavus* NRRL3357) fueron capaces de mantener una interacción mutualista con la presencia del BFA.

Con respecto a las variables, el aumento en la producción de CO₂ en los primeros días de la fermentación, nos muestra la capacidad del CF de co-metabolizar la glucosa y el BFA, lo que permite la degradación parcial o total de la fuente secundaria (BFA). La disminución en los perfiles de pH en los tratamientos con el CF nos permite sugerir que la disminución se debe a la producción de ácidos orgánicos. El consumo de azúcar no fue del 100%, sin embargo, la diferencia en el aumento de la producción de biomasa en los días finales de la fermentación en el tratamiento que contiene BFA en comparación con el que no lo tiene, nos puede indicar que el consorcio fúngico puede estar utilizando al BFA como fuente secundaria para su crecimiento. La producción enzimática de Mn-P se vio estimulada por la presencia de BFA, contrario a lo que presento la producción enzimática de lacasas que se mostró inhibida cuando el xenobiótico estaba presente.

Los hongos filamentosos al igual que las levaduras presentan una maquinaria metabólica altamente eficiente, capaces de crecer en presencia de diversas fuentes de carbono y nitrógeno, así como, en presencia de contaminantes como hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas y plastificantes (Zafra y cols. 2015; Ahuactzin-Pérez y cols. 2018). Fuentes-Tejeda (2019) reporta el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento radial y la producción de biomasa de hongos filamentosos no-ligninolíticos. Este autor reportó el uso de glucosa, sacarosa y maltosa como fuentes de carbono y (NH₄)₂SO₄, extracto de levadura y peptona de caseína como principales fuentes de nitrógeno. La combinación entre la glucosa y el extracto de levadura, fue el medio de cultivo que permitió la mayor velocidad de crecimiento radial, así como la producción de biomasa en los hongos del género, *Fusarium*, *Trichoderma* y

Aspergillus, microorganismos empleados en la investigación antes mencionada. Al igual que lo reportado en la investigación anterior, en este trabajo se emplearon 10 g de glucosa como principal fuente de carbono, la selección de la glucosa como principal fuente de carbono, radica en que los hongos filamentosos, en particular los del género *Aspergillus*, asimilan la glucosa por medio de las hifas a través de procesos de difusión pasiva (Legisa y cols. 2007). Aunque también pueden asimilarlo empleando procesos de difusión facilitada, esperando en este caso, que el metabolismo del consorcio se vea afectado al incrementar el gradiente de la glucosa entre el medio externo y la membrana citoplasmática (Reyes-Ocampo y cols. 2013). Con respecto de la fuente de nitrógeno, se evaluaron tres medios de cultivo (GYE, Czk y Toyamas) que contenían extracto de levadura, nitrato de sodio y sulfato de amonio, respectivamente. El medio de cultivo que permitió la mayor velocidad de crecimiento radial de la mayoría de los hongos empleados en esta investigación fue el medio Toyamas que contenía sulfato de amonio a diferencia de las otras fuentes de nitrógeno. Gil y cols. (2012) estudiaron el uso de fuentes de nitrógeno inorgánicas para la producción de enzimas polifenol oxidasas de *P. ostreatus*. Estos autores reportan la mayor producción de enzimas lacasas en los tratamientos donde emplean NH_4Cl como fuente de nitrógeno a diferencia de los tratamientos con KNO_3 , donde el crecimiento de *P. ostreatus* y la producción de sus enzimas lacasas disminuye. Por otro lado, Ahuactzin-Pérez y cols. (2014) reportan el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno, lo que favoreció el crecimiento de diferentes hongos filamentosos crecidos en presencia de 500 y 1000 mg/L de dibutil ftalato. Algo similar a lo reportados por los dos autores antes mencionados, fue lo encontrado en nuestra investigación, el medio toyamas, compuesto por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ favoreció el crecimiento radial tanto en el tratamiento con y sin BFA. Lo que nos permite sugerir, que los hongos filamentosos muestran mayor facilidad de fijar los compuestos inorgánicos derivados del amoníaco (compuestos que presentan menor energía de enlace) a diferencia de los derivados del nitrito 61-66

Respecto, a la tolerancia de los hongos del género *Aspergillus*, crecidos en presencia de un rango de 0 a 500 ppm de BFA. Los hongos *A. flavus* y *A. terreus* mostraron la mayor velocidad de crecimiento radial en los medios adicionados con 100 y 200 ppm de BFA, sin embargo, al aumentar la concentración del contaminante la velocidad de crecimiento radial disminuye. Algo similar a nuestros resultados, es lo que reporta Ramírez-Mendóza en el (2018)

quien evaluó la velocidad de crecimiento radial de *Trichoderma viride* crecido en medio GYE adicionado con 50 y 75 ppm de BFA (concentraciones por debajo en comparación con las que encontramos mayor velocidad). Este autor menciona que conforme aumenta la concentración de BFA disminuye la velocidad de crecimiento, lo que sugiere que el BFA en altas concentraciones inhibe la síntesis de proteínas involucradas en la elongación micelial de este hongo. Por otra parte, Ahuactzin-Pérez y cols. (2014) determinaron la velocidad de crecimiento radial de diferentes hongos filamentosos crecidos sobre 500 y 1000 ppm de dibutil ftalato (DBF) (compuesto análogo al BFA). Estos autores, describen que a mayor concentración del compuesto incrementa la velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa. Además, de que hay una correlación positiva entre el incremento del grosor de la pared celular y el diámetro de la hifa de los hongos evaluados y que esto es directamente proporcional al incremento de la concentración de DBF. Por lo que sugieren que el DBF es empleado como fuente secundaria de carbono y energía ya que al aumentar la concentración aumenta la producción de biomasa, el diámetro de la hifa y el grosor de la pared celular. Por otro lado, Lenoir cols., (2016) mostraron el crecimiento de hongos micorrícicos crecidos en diferentes compuestos xenobióticos (diesel, crudo de petróleo, fungicidas y PAHs) demostrando que la presencia de este tipo de compuestos disminuye tanto la esporulación como la elongación radial de las hifas de estos hongos. Se sugiere que en el caso donde la esporulación desaparece dando paso al desarrollo de micelio aéreo se debe al silenciamiento de genes que se encuentran involucrados en el proceso de esporulación debido a que, en las concentraciones de 300, 400 y 500 ppm el crecimiento del hongo además de disminuir, no muestra sus estructuras reproductivas como son las esporas.

Con respecto a los porcentajes de inhibición, Sosa-García (2020) evaluaron la tolerancia de diferentes hongos aislados de efluentes industriales. Los hongos fueron crecidos a diferentes concentraciones de BFA (0, 50, 100, 300, 500 y 700 ppm) donde midieron la velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa. Los hongos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sp*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.* y *Acremonium sp*, fueron los que mostraron porcentajes de inhibición por debajo del 50 % en la concentración de 300 ppm, sin embargo, en las concentraciones de 500 y 700 el porcentaje de inhibición incrementa por arriba del 80 %, por lo que emplearon estos hongos en sus siguientes determinaciones.

A diferencia de lo antes mencionado, es lo que reportamos en este trabajo, cerca del 90 % de las colonias evaluadas no toleraron concentraciones por arriba de 200 ppm, obteniendo porcentajes de inhibición de 59 a 74 % en la concentración de 300 ppm, 59 a 86 % en la concentración de 400 ppm y por último, de 70 a 95 % de inhibición en la concentración de 500 ppm. Por lo que la concentración máxima tolerable para las siguientes determinaciones fue 200 ppm. Las colonias de hongos *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* 1V, *A. niger* 321, *A. niger* SCB, *A. niger* Mn-P y *A. nidulans* mostraron porcentajes de inhibición por debajo del 50 % en la concentración de 200 ppm, por lo que fueron las colonias seleccionadas para realizar las pruebas de antagonismo. Es importante señalar que la presencia de concentraciones altas como lo son 300 y 400 ppm de BFA, no sólo muestran un efecto inhibitorio en el desarrollo vegetativo de las colonias de hongos, sino, también en el crecimiento polarizado de las hifas jóvenes, encargadas del suministro energético a toda la colonia. Si bien se conoce que los hongos filamentosos son células con un crecimiento altamente polarizado que se encuentra en constante elongación de sus puntas, podríamos sugerir que la presencia del BFA tiene un efecto directo sobre las proteínas que son encargadas del crecimiento polarizado, como es el caso de la F-actina. Berepiki y cols. (2011) menciona que existen tres diferentes estructuras de F-actina de orden superior que están encargadas de manera particular y específica de distintas funciones en los hongos filamentosos. En primer orden los anillos de actina, que en conjunto y cooperación con la miosina II, están involucrados en la formación del tabique (Delgado-Alvarez cols. 2014). Otra de las estructuras son los parches de actina, estas estructuras suelen localizarse cerca de maquinaria endocítica participando en el transporte vesicular intracelular (Araujo-Bazan y cols. 2008; Shaw y cols. 2021).

Por último, se encuentran los cables de actina, microfilamentos de actina cortos, probablemente contienen forminas que se encuentran presentes en los vértices de las hifas, y una de sus principales funciones es servir como mecanismo de transporte para las vesículas secretoras dependientes de miosina V y que secretan sustancias que se sintetizan en otros organelos y los transportan hacia la punta (Taheri-Talesh y cols. 2012; Berepiki y cols. 2011). Además, de que el BFA puede afectar directamente a los filamentos de F-actina también se sugiere que puede estar involucrado directamente en la deficiencia vesicular secretora que se ubica en la punta de las hifas, mejor conocido como "Spitzenkörper", estructura que determina

la dirección del crecimiento vegetativo y la forma de las hifas (Riquelme y cols. 2014). La idea del efecto que ocasiona el BFA sobre los microfilamentos de F-A en hongos filamentosos es sustentada por Stavropoulou y cols. (2016) quienes reportan en la planta *Zea mays* una desorganización rápida de los microfilamentos de F-actina ocasionado por la presencia de BFA de manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición.

Con respecto a la construcción de consorcios fúngicos, existen diversas metodologías que permiten la mezcla de grupos de microorganismos con la finalidad de que estos trabajen de forma sinérgica y potencien la degradación de diversos sustratos (Torres-García y cols. 2021). En esta investigación se empleó una metodología estandarizada por Torres-García y cols. (2021) donde integra interacciones ecológicas entre hongos filamentosos, descritas previamente por Tuininga (2005) como son; coantagonismo, antagonismo, agonismo, cohabitación, comensalismo y mutualismo. A estas interacciones, se les concedió un valor categórico y posteriormente, se determinó la interacción existente entre cepas desafiadas vs desafiantes y las triples interacciones cuando se encuentran como desafiantes.

Los resultados mostrados en esta investigación permitieron observar tanto en los tratamientos sin BFA y con 200 ppm de BFA interacciones como: coantagonismo, agonismo, cohabitación y mutualismo. En resumen, nuestra investigación empleó hongos filamentosos mediante una selección natural inducida en la que los microorganismos mejor adaptados a las nuevas condiciones de contaminación desplazaron y reemplazaron gradualmente a aquellos organismos menos adaptados. Por otro lado, se ha reportado, que la presencia de contaminantes como PAHs producen un efecto tóxico, pero al mismo tiempo enriquecedor sobre las poblaciones microbianas (Gloer 2007). Los efectos tóxicos son eficaces en la selección de cepas más adaptadas y el enriquecimiento se produce cuando los microorganismos pueden utilizar el contaminante como fuente de carbono y energía. Ha diferencia de lo reportado por Zafra y cols. (2015) donde evaluó las posibles interacciones ecológicas presentes en el crecimiento de hongos filamentosos y bacterias, la determinación realizada estuvo sujeta a la percepción visual del investigador, a pesar de que se empleen técnicas microscópicas, el análisis fue estrictamente cualitativo. Por lo que difiere con nuestro análisis, donde consideramos una interacción ecológica verdadera, apoyada de la microscopia y donde se les asignó un valor gradual con

respecto a los cambios de antagonismo a mutualismo, de esta forma aseguramos la construcción de un consorcio fúngico completamente sinérgico.

Como parte de la fisiología y metabolismo de los microorganismos, el uso de fuentes de carbono como glucosa, permite de manera inicial el crecimiento y producción de biomasa, con la finalidad de que el microorganismo (en el caso de los hongos) produzcan de manera eficiente los metabolitos primarios como las enzimas involucradas en la degradación, no sólo de la principal fuente de carbono, sino, de una segunda fuente de carbono (Ahuactzin-Pérez 2018). Ha este proceso se le considera co-metabolismo, mismo que permite la degradación parcial o total (mineralización) de la fuente secundaria, que en caso de biorremediación concluye en la producción de CO₂ y H₂O (Zafra y cols. 2015; 2016: Ahuactzin-Pérez y cols. 2018). Pacheco-Cabañas (2018) reporta el uso de consorcios microbianos mixtos durante el proceso de degradación de PHAs, en esta investigación, emplean hongos del genero *Aspergillus*, *Trichoderma* y bacterias del género *Bacillus*, *Klebsella* y *Pseudomonas*. El autor antes mencionado, demuestra la eficiencia en la degradación de concentraciones de 5000 ppm de fenantreno y pireno, y concluyen con base en la producción de CO₂ que estos compuestos tóxicos, no sólo son biorremovidos de los sistemas de fermentación, sino, que se pueden estar mineralizando, dado que la producción de CO₂ incrementa en los tratamientos con fenantreno y pireno en comparación con el tratamiento que no contiene estas moléculas. Por otro lado, uno de los pocos trabajos donde se emplean consorcios fúngicos para la degradación de BFA es lo reportado por López-Garrido (2019), en esta investigación evalúan la eficiencia de remoción y degradación de 200 ppm de BFA empleando un consorcio fúngico estructurado por hongos del genero *Aspergillus*, *Talaromices* y *Fusarium*. Estos autores reportan la degradación del 60 % de la concentración inicial, sin embargo, al bioestimular el consorcio con la adición un residuo agroindustrial (olote de maíz) potencia la degradación alrededor del 90 % de la concentración inicial. Similar a lo reportado por Pacheco-Cabañas (2018) y López-Garrido (2019) en esta investigación la producción de CO₂ es mayor durante los primeros 4 días de la fermentación en el tratamiento que contiene BFA, a diferencia del tratamiento que no lo contiene. Sin embargo, se debe realizar el análisis de biorremoción, para considerar la eficiencia de nuestro consorcio, así como el análisis de intermediarios empleando técnicas como GC-MS, para poder sugerir de manera directa la degradación del BFA en intermediarios menos tóxicos. Se han realizado

investigaciones empleando consorcios bacterianos como modelos para la degradación de BFA, a pesar de que se logran eficiencias de degradación del 90 y 50 % con base en la concentración inicial, los intermediarios producidos por este tipo de consorcios como es el caso del ácido 1,2-Benzenodicarboxílico mono (2-etilhexil) éster suelen ser tóxicos para otros organismos (Sarma y cols. 2018).

Existen diversos modelos matemáticos que explican la cinética de producción de CO₂ durante los procesos de biodegradación de contaminantes tóxicos. Uno de estos modelos es la ecuación logística, que explica el incremento de la producción de CO₂ con respecto al tiempo, considerando las fases de crecimiento, lag, log y de adaptación. Volke-Sepúlveda y cols. (2016) reportan la tasa específica de producción de CO₂ (μCO_2) de *Aspergillus brasiliensis* crecido en diferentes concentraciones de glucosa. Estos autores reportan que la μCO_2 incrementó directamente proporcional al incremento de la fuente de carbono. Similar a lo reportado por estos autores en nuestra investigación la μCO_2 fue mayor en el tratamiento con BFA (mayor fuente de carbono), a pesar del CO₂máx y el Y CO₂/S fue mayor en el medio que no tenía BFA. Lo que nos permite sugerir, que el consorcio fúngico incrementa la μCO_2 durante la fase exponencial del crecimiento que se encuentra durante los primeros 4 días del crecimiento, debido a que la presencia de BFA, induce a la producción de enzimas encargadas de la degradación no sólo de la principal fuente de carbono (glucosa) sino del propio BFA.

Con respecto a los perfiles del pH, se puede observar en esta investigación un decremento de los valores en el tratamiento con BFA y sin BFA, como parte del metabolismo del consorcio fúngico. Similar a lo que mostramos en esta investigación es lo que reporta Ahuactzin-Perez y cols. 2014; 2017; 2018) donde evalúan los perfiles del pH de hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Fusarium*, crecidos en fermentación sumergida conteniendo DBF (compuesto análogo al BFA). Estos autores reportan la producción de ácidos hexadecanoicos y octadecanoicos como parte del crecimiento y degradación de esta molécula, lo que les permite sugerir que la disminución del pH en tratamientos que contienen una segunda fuente de carbono se debe a la degradación del contaminante en este tipo de intermediarios, sin embargo, a diferencia de lo reportado por los autores antes mencionados, en nuestra investigación no se muestra diferencia significativa entre los perfiles del pH de los tratamientos con y sin BFA. Lo que nos permite sugerir que la disminución del pH se debe a la producción de ácidos orgánicos

como el ácido cítrico, esto con base en que el consorcio fúngico esta estructurado por hongos del género *Aspergillus*, y se ha reportado que este tipo de hongos, en particular *Aspergillus niger* son excelente productores de ácido cítrico (Chroumpi y cols. 2020).

Volke-Sépulveda et al (2016) reporta que ha altas concentraciones de glucosa la regulación de genes que sintetizan enzimas encargadas del catabolismo se ve afectada a la baja a diferencia de los genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios (anabolismo), y que la producción de metabolitos secundarios como el ácido cítrico inhibe la degradación de la glucosa. Lo que nos permite sugerir al observar nuestros resultados del consumo de glucosa en los tratamientos con y sin BFA que la glucosa a una concentración de 10 mg/L no logra degradarse al 100 % debido a que el consorcio produce de manera inducida ácido cítrico, bloqueando la regulación de genes involucrados en la degradación de la glucosa como parte del metabolismo central del consorcio (Chroumpi y cols. 2020). Sin embargo, a pesar de que el metabolismo central se pueda ver afectado por este tipo de fisiología, se sugiere que sin importar que la glucosa no se degrade al 100 % el consorcio fúngico puede estar utilizando al BFA como fuente secundaria para su crecimiento, debido a que la producción de biomasa es mayor en el último día de la fermentación, a diferencia del tratamiento que no contiene BFA. Esto se puede contrastar de manera positiva con los resultados reportados por Torres-Hernández (2019) y Torres-García (2019) donde evaluaron la producción máxima de biomasa de los hongos *A. terreus* y *A. flavus*, respectivamente, crecidos en presencia de 250 y 300 ppm de BFA. Estos autores reportan que la producción de biomasa es directamente proporcional al incremento de la concentración de BFA máxima tolerable, y que estos hongos pueden estar utilizando al BFA como fuente secundaria de carbono y energía debido a que a diferencia con nuestra investigación, ellos reportan el consumo del 100 % de la fuente primaria (glucosa) de carbono. Torres-García (2019) reporta la producción de enzimas lacasas por el hongo *A. flavus* crecido en presencia de 0, 100 y 300 ppm de BFA. Este autor menciona que la producción de enzimas lacasas, así como los parámetros cinéticos de producción de lacasas son mayores en el medio que contiene la máxima concentración de BFA. Por otro lado, Zafra et al. (2016) reporta que las lacasas son las primeras enzimas responsables de la degradación de compuestos fenólicos como los PAHs. Ahuactzin y cols. (2018) reporta que el hongo *Fusarium culmorum* produce mayor cantidad de enzimas esterasas que de lacasas al crecer en presencia de di (2-etilhexil) ftalato,

sin embargo, menciona que las lacasas al ser enzimas dioxigenasas participan en la ruptura del anillo aromático de este compuesto. Contrario a lo reportado por Torres-García (2019), la producción de lacasas en esta investigación es menor en el tratamiento con BFA a diferencia de la producción en el tratamiento sin BFA. Sin embargo, la producción de lacasas durante el día 2 es mayor en el tratamiento con BFA en comparación con el tratamiento sin BFA, lo que nos permite inferir que el consorcio produce de manera importante estas enzimas como parte de las primeras reacciones de degradación de BFA. Díaz y cols. (2013) reportan la producción de enzimas lacasas a diferentes pHs iniciales de crecimiento, estos autores concluyen que el pH óptimo de producción de enzimas lacasas es de 6.5, lo que nos permite sugerir que al disminuir los perfiles del pH en los tratamientos con y sin BFA afecta de manera negativa la regulación de genes involucrados con la producción de algunas izoenzimas de lacasas o isoformas de lacasas.

Por otra parte, Torres-García et al (2021b) realizaron una revisión bibliográfica donde reportan las principales enzimas responsables de la degradación del BFA, y a pesar de que los reportes existentes mencionan a las enzimas lacasas como enzimas que participan en la degradación del BFA, estos autores reportan la integración de varias vías metabólicas reportadas hasta el momento y mencionan que las enzimas Mn-P son enzimas que participan mayormente en la degradación del BFA por hongos ligninolíticos y no-ligninolíticos. Torres-Hernández (2019) reporta la producción de enzimas Mn-P, empleando diferentes metodologías para su cuantificación y encontró que la producción de estas enzimas por el hongo *A. flavus* incrementa conforme aumenta la concentración del BFA en una fermentación sólida. Al contrastar los resultados de esta investigación con los antes mencionados, se muestran similitudes bastante notorias, ya que la producción de Mn-P es mayor en comparación con las enzimas lacasas y esta producción incrementa durante los primeros 6 días de la fermentación con la presencia del BFA. Lo que nos permite sugerir que el ciclo catalítico de las Mn-peroxidasas depende de la producción de intermediarios menos estables químicamente entre sus enlaces como parte del metabolismo central del consorcio fúngico. Torres-García y Torres-Hernández en el (2019) reportan los parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas, y que estos parámetros son mayores en los tratamientos con mayor concentración de BFA. A diferencia de lo antes mencionado, en esta investigación, la mayor Em_{\max} tanto para lacasas como para Mn-P es mayor

en el tratamiento sin BFA, sin embargo, la producción de estas enzimas durante los primeros días, es crucial para la degradación del BFA en intermediarios que puedan resultar menos tóxicos que el BFA

9. CONCLUSIONES

Los hongos filamentosos como herramienta de la biorremediación se han utilizado en los últimos años. Específicamente, el género *Aspergillus* se adapta a diferentes matrices ambientales y mantiene su crecimiento sobre diversidad de contaminantes. Los consorcios fúngicos *in vivo* establecen interacciones para permanecer en el medio interactuando con diversidad de contaminantes, el presente estudio determinó la capacidad del consorcio fúngico de *Aspergillus* de crecer sobre un medio de cultivo. con la mayoría de interacciones mutualistas con una fuente de nitrógeno de sulfato amonio sobre una concentración máxima tolerable de 200mg/L de BFA, esto indica que el consorcio fúngico tiene la capacidad de adaptarse y utilizar este contaminante como fuente de carbono y co-metabolizar la glucosa presente en el medio o en un matriz ambiental. La producción de metabolitos secundarios por los hongos son utilizados de forma industrial y en técnicas como la biorremediación, enzimas como lacasas y manganeso peroxidasas participan en la degradación del BFA, las enzimas manganeso peroxidasas mostraron una mayor producción al momento de interactuar con el BFA y el consorcio fúngico, lo que indica que este contaminante estimula la producción de estas enzimas, así como una mayor producción de dióxido de carbono como índice de crecimiento del consorcio fúngico durante el periodo de crecimiento. El presente estudio da la base para estudiar la aplicación *in vivo* del consorcio fúngico de *Aspergillus* sobre matrices contaminadas con BFA. Por otro lado, los resultados mostrados con respecto a la producción de enzimas nos permiten sugerir el uso exclusivo de enzimas para remediar ciertas matrices con las pruebas adecuadas.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar el análisis de intermediarios y el porcentaje de biodegradación de los extractos contaminados con BFA y la presencia de consorcio fúngico durante los días de la fermentación.
- Realizar un bioensayo de toxicidad en la línea celular HepG2, empleando los sobrenadantes de la fermentación sumergida con los distintos tratamientos para conocer si la toxicidad disminuye con la presencia del consorcio fúngico y realizar la comparación si los metabolitos secundarios presentan un nivel de toxicidad mayor o menos al propio BFA.
- Realizar las pruebas necesarias para la aplicación del consorcio en el medio para una degradación *in vivo*.

11. REFERENCIAS

- Abdul L, Si X, Sun K, Si Y. 2021. Degradation of bisphenol A in aqueous environment using peroxymonosulfate activated with carbonate: Performance, possible pathway, and mechanism. *J. Environ. Chem. Eng.* 9,105419.
- Aghajanzpour-Mir SM, Zabihi E, Akhavan-Niaki H, Keyhani E, Bagherizadeh I, Biglari S, Behjati F. 2016. The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *Int J Mol Cell Med* 5: 19-29.
- Ahmadkhaniha R, Mansouri M, Yunesian M, Omidfar K, Jeddi M, Larijani B, Rastkari, N. 2014. Association of urinary bisphenol a concentration with type-2 diabetes mellitus. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 12: 64.
- Ahuactzin-Pérez M, Tlecuitl-Beristain S, García-Dávila J, Santacruz-Juárez E, González-Pérez M, Gutiérrez-Ruíz MC, y Sánchez C. 2014. Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum*. *Biotech*, 8(1).
- Ahuactzin-Pérez M, Tlecuitl-Beristain S, García-Dávila J, Santacruz-Járez E, González-Pérez M, Gutierrez-Ruíz C, Sánchez C. 2018. Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum*. *Biotech* 8.
- Alexander M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation* 2nd ed. Academic Press, London.
- Ancasi, E., Carrillo, L., Ahrendts, M. 2006. Mohos y levaduras en agua envasada y bebidas sin alcohol. *Revista Argentina de Microbiología.* 38: 93-96.
- Araujo-Bazan L., Penalva M. A., Espeso E. A. 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 67 891–905.
- Arca-Ramos A, Eibes G, Feijoo G, Lema JM, Moreira MT. 2015 Potentiality of a ceramic membrane reactor for the laccase-catalyzed removal of bisphenol A from secondary effluents. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99, 9299–9308.
- Arrúa A, Moreno E, Quezada M, Moreno J, Vázquez E, Flores A. *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(5):1047-52.

- Aydin S, Karaçay A, Shahi A, Gökçe S, Ince B, Ince, O. 2016. Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Fungal Biology Reviews* 31(2): 61–72.
- Bennet J. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecul Biol an Gen.* 1-17
- Berepiki A., Lichius A., Read N. D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 876–887.
- Bhandari S, Kumar D, Marahatha R, Dawadi S, Khadayat K, Phuyal S, Shrestha S, Gaire S, Basnet K, Khadka U, Parajuli N. 2021. Microbial Enzymes Used in Bioremediation. *J. Chemistry.* 8849512,1-17.
- Bindhumol V, Chitra C, Mathur P. 2003. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*, 188(2-3): 117–124.
- Björnsdotter K, Jonker W, Legradi J, Kool J, Ballesteros-Gómez A. 2017. Bisphenol A alternatives in thermal paper from the Netherlands, Spain, Sweden and Norway. Screening and potential toxicity. *Science of The Total Environment*, 601-602, 210–221
- Bottomley PJ. 2004. Principles and Applications of Soil Microbiology. *Microbial Ecology.* 149-167
- Bučková, M, Godočíková, J, Polek B. 2007. Responses in the mycelial growth of *Aspergillus niger* isolates to arsenic contaminated environments and their resistance to exogenic metal stress *Journal Basic Microbiology* 47: 295–300.
- Burmolle M, Webb S, Rao D, Hansen H, Sorensen J., Kjelleberg S. 2016. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3916–3923.
- Caballero-Casero N, Rubio S. 2017. Metodología general para la multideterminación de bisfenoles en fuentes de exposición y fluidos biológicos basada en la combinación de disolventes supramoleculares y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Universidad de Cordoba.* 64-65.
- Chandra R, Chowdhary P. 2015. Properties of Bacterial Laccases and Their Application for Bioremediation of Industrial Waste. *Environ Sci Process Impacts.* 101039, 2-40.

- Che S, Men Y. 2019. Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
- Chen B, Wang Y, Hu D. 2010. Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 845–851.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35, 93–96.
- Clayton E, Todd M, Dowd J, Aiello A. 2010. The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006 119: 390-396.
- Clukey E, Lepczyk A, Balazs H, Work M, Li Q, Bachman J, Lynch M. 2018. Persistent organic pollutants in fat of three species of Pacific pelagic longline caught sea turtles: Accumulation in relation to ingested plastic marine debris. *Science of The Total Environment* 610-611, 402–411.
- Cordoba A. 2009. Selección de un Consorcio Fúngico inmovilizado sobre *Furcraea* sp. Para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Pontifica Universidad Javeriana.
- Corrales J, Kristofco LA, Baylor-Steele W, Yates BY, Breed CS, Spencer W, Brooks BW. 2015. Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of Its occurrence and bioaccumulation. *Int J* 3: 1-29.
- Dallio M, Masarone M, Errico S, Gravina AG, Nicolucci C, Di Sarno R, Federico, A. 2018. Role of bisphenol A as environmental factor in the promotion of non-alcoholic fatty liver disease: *in vitro* and clinical study. *Alime Phogy & Tics* 47: 826–837
- Delgado-Alvarez D. L., Bartnicki-Garcia S., Seiler S., Mourino-Perez R. R. 2014. Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. *PLoS ONE* 9:e96744
- Deng Y, Yan C, Nie M, Ding M. 2021. Bisphenol A adsorption behavior on soil and biochar: impact of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-12
- Di Donato M., Cernera G, Giovannelli P, Galasso G, Bilancio A, Migliaccio A, Castoria G. 2017. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Mol Cell End* 457: 35-42.
- Díaz R, Téllez-Téllez M, Sánchez C, Bibbins-Martínez M, Díaz-Godínez G, y Soriano-Santos J. 2003. Influence of initial PH of the growing medium on the 12 activity, productior and

- genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. *Electric J. biotech.* 1-13
- Djelal H y Amrane A. 2013. Biodegradation by bioaugmentation of dairy wastewater by fungal consortium on a bioreactor lab-scale and on a pilot-scale. *J Env S.* 9: 1906-1912.
- Doherty L, Bromer J, Zhou Y, Aldad T, Taylor H. 2010. Inutero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: anepigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breastcancer. *Hormones and cancer* 3: 146-155.
- Doriya K, Jose N, Gowda M, Kumar D. 2016. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. *Advances in Food and Nutrition Research* 115–135.
- Eckardt, M, Simat T J. 2017 Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017. *Chemosphere* 186: 1016–1025.
- Eio E, Kawai M, Tsuchiya K, Yamamoto S, Toda T. 2019. Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 96,166-173.
- Escalona I, de Grooth J, Font J, Nijmeijer K. 2014. Removal of BPA by enzyme polymerization using NF membranes. *J Mem S* 468: 192-201.
- Ferreira A, Mahboubi A, Lennartsson R, Taherzadeh J. 2015. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresource Technology* 215: 334–345.
- Ferreira J. 2016. Integration of Filamentous Fungi in Ethanol Dry-Mill Biorefinery (Ph.D. thesis). Swedish Centre for Resource Recovery, University of Borås, Borås, Sweden.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S. y Wallace, E. 2012. Bisphenol A exposure, effects and policy; A wildlife perspective. *Journal of Enviromental Managment.* 104, 19-34.
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Magagnini, M., Nikolopoulou, M., Marasco, R., ... Kalogerakis, N. 2015. Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *Journal of Hazardous Materials,* 287, 78–86.

- Fouda A, Khalil AMA, El-Sheikh HH, Abdel-Rhaman EM, Hashem AH. 2015. Biodegradation and detoxification of bisphenol-A by filamentous fungi screened from nature. *J Ad Biol Bioch.* 2: 123-132.
- Fuentes-Tejeda JA. 2019. Crecimiento de hongos filamentosos provenientes de suelos contaminados sobre diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Gálvez, Y. N. 2014. Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus niger* MnP y su cepa parental en presencia de fenantreno en cultivo sólido y líquido. Tlaxcala, Tepetitla de Lardizabal. Instituto Politécnico Nacional.
- García J, Gallego C, Font G. 2015. Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Rev. Toxicol.* 32(2), 144-160.
- Gibbs A, Seviour J, Schmid F. 2020. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1): 17–48.
- Gil M, Manjarres-Pinzon K, Piñeros-Castro Y, Rodriguez-Sandoval E. 2012. Enfluence the addition of nitrogen Source on production of ligninases. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 10(1), 173-181.
- Gmoser R, Sintca C, Taherzadeh J, Lennartsson, R. 2019. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. *Waste Management* 97: 63–70.
- Golshan M, Jorfi S, Haghhighifard N, Takdastan A, Ghafari S, Rostami S, Ahmadi M. 2019. Development of salt-tolerant microbial consortium during the treatment of saline bisphenol A-containing wastewater: Removal mechanisms and microbial characterization. *J. Water Process. Eng.* 32, 100949.
- Graziani N, Carreras H, Wannaz E. 2019. Atmospheric levels of BPA associated with particulate matter in an urban environment. *Heliyon.* 5, 01419
- Guerrero-Ortíz P, Quintero-Lizaloe R, Espinoza-Hernández V, Benedicto-Valdés y Sánchez-Colín M. 2012. Respiración de co2 como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de lupinus. *Terra latinoamericana.* 30 (4).

- Gupta S, Lee L., Chen N. 2018. Analysis of Improved Nutritional Composition of Potential Functional Food (Okara) after Probiotic Solid-State Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(21): 5373–5381.
- Gutiérrez M Droguet. 2002. Identificación de compuestos volátiles por cg-ms 35 boletín intexter. *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor* 35: 122
- Halden RU. 2010. Plastics and Health Risks. *Annual Review of Public Health* 31: 179–194.
- Hanioka N, Jinno H, Nishimura T, Ando M. 1998. Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Archives of Toxicology*, 72: 387–394.
- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 454–466.
- Husain Q y Qayyum S. 2013. Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33(3), 260-292.
- Ikeda Y, Parke E, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 97(8): 1030–1035.
- Ikehata K, Buchanan I, Smith D. 2016. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Environ. Eng. Sci.* 3, 1-19.
- Jaiswal S, Sharma B, Shukla P. 2019. Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology & Innovation*. 1-55
- Karpe V, Beale J, Morrison D, Harding H, Palombo A. 2015. Untargeted metabolic profiling of *Vitis vinifera* during fungal degradation. *FEMS Microbiology Letters*, 362(10)
- Klitgord N, Segrè D. 2011. Ecosystems biology of microbial metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 22(4): 541–546.
- Knez J, Kranvogel R, Breznik BP, Vončina E, Vlaisavljević, V. 2014. Are urinary bisphenol A levels in men related to semen quality and embryo development after medically assisted reproduction. *Fert Ste* 101: 215-221.
- Korkmaz A, Ahabab M, Kolankaya D, Barlas N. 2010. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (2010), 2865–2871.

- Kosseva R. 2013. Recovery of Commodities from Food Wastes Using Solid-State Fermentation. *Food Industry Wastes* 77–102
- LaPara M, Zakharova T, Nakatsu H, Konopka A. 2002. Functional and Structural Adaptations of Bacterial Communities Growing on Particulate Substrates under Stringent Nutrient Limitation. *Microbial Ecology* 44(4): 317–326.
- Legiša, M., Matthey, M. 2007. Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett.* 29, 181–190
- Lenoir I, Fontaine J, y Lounès-Hadj A. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*, 123, 4–15.
- Lesser, L. E., Mora, A., Moreau, C., Mahlkecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A. I. y Barrios-Piña, H. 2018. Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system, Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere*. 198, 510–521
- Li D-K, Miao M, Zhou Z, Wu Ch, Shi H, Liu X, Wang S, Yuan W. 2013. Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school-age children. *PLoS* 8: 65399–65410.
- Limura Y, Yoshizumi M, Sonoki T, Uesigi M, Tatsumi K, Horiuchi K, Kajita S, Katayama Y. 2007. Hybrid aspen with a transgene for fungal manganese peroxidase is a potential contributor to phytoremediation of the environment contaminated with bisphenol A. *J Wood Sci.* 53, 541–544
- Liu J, Zhang L, Lu G, Jiang R, Yan Z, Li Y. 2021. Occurrence, toxicity and ecological risk of Bisphenol A analogues in aquatic environment – A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111481.
- LuckertHercog K, Maisanaba S, Filipic M, Sollner-Dolenc M, Kac L, Zegura B. 2019. Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Scien of the T Envi* 687: 267-276
- Malaviy P y Rathore VS. 2007. Bioremediation of pulp and paper mill effluent by a novel fungal consortium isolated from polluted soil. *Bio Techno.* 98: 3647-3651.

- Manzur A, Limón-González M, Favela-Torres E. 2004. Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *Journal of Applied Polymer Science* 92(1): 265–271.
- Martins M, Núñez O, Gallart-Ayala H, Leitão C, Galceran T, Silva Pereira C. 2014. New branches in the degradation pathway of monochlorocatechols by *Aspergillus nidulans*: A metabolomics analysis. *Journal of Hazardous Materials* 26: 264–272.
- Meeker J, Calafat A, Hauser R. 2010. Urinary bisphenol A concentration in relation to serum thyroid and reproductive hormones in men from an infertility clinic. *Env S Techno* 44: 1458-1463.
- Meyer V, Wu B, Ram J. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* 33(3): 469–476
- Mielgo I, López C, Moreira MT, Feijo G, Lema JM. 2003. Oxidative Degradation of Azo Dyes by Manganese Peroxidase under Optimized Conditions. *Biotechnol. Prog.* 19, 325–331
- Mohapatra DP, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY. 2010. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chem Env Ches.* 8: 923-941.
- Molla AH, Fakhru, A, Abd-Azizand S, Hanafi MM. 2001. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *W J Micro Biotech* 17: 849-856.
- Moon M, Jeong I, Oh T, Ahn H, Kim H, Park Y, Jang H, Park K. 2015. Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin resistance. *Journal of Endocrinology.* 226 (1), 35-42.
- Morrissey R. 1987. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice*1. *Fundamental and Applied Toxicology*, 8(4): 571–582.
- Murata M, Kang J.-H. 2017. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology Advances* 36: 311–327.
- Nahar M, Liao C, Kannan K, Dolinoy D. 2012. Fetal Liver Bisphenol A Concentrations and Biotransformation Gene Expression Reveal Variable Exposure and Altered Capacity for Metabolism in Humans. *J Biochem molecular Toxicol*, 27(2), 166-123.

- Nicolucci, C, Errico S, Federico A, Dallio M, Loguercio C, Diano N. 2017. Human exposure to Bisphenol A and liver health status: Quantification of urinary and circulating levels by LC-MS/MS. *J Phar Biom Ana* 140: 105-112.
- Ochoa D y Montoya A. 2010. Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Okada M. 2002. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* 27(1): 87-133.
- Palmer A, Lee S, Solomon E. 2001. Decay of the Peroxide Intermediate in Laccase: Reductive Cleavage of the O-O Bond. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6591-6599.
- Pandey A, Höfer R, Larroche C, Taherzadeh M.J, Nampoothiri M. 2015. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier, USA
- Park H, Jun S, Han K, Hong S, Yu J. 2017. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Advances in Applied Microbiology*. 100, 161-202
- Park J, Lee M, Yoon D, Han J, Kim M, Hwang U, Jung J, Lee J. 2018. Effects of bisphenol A and its analogs bisphenol F and S on life parameters, antioxidant system, and response of defense in the marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquat. Toxicol.* 199, 21-29.
- Pontón, J., Moragues, D., Gené, J., Guarro y G Quindós. 2002. Hongos y Actinomicetos Alergénicos. *Revista Iberoamericano de Micología*. Vasco, España.
- Praveen SV, Manjunatha BK, Bhat P, Veena R, Somanathan S, Pawate Yogashree M. 2016. Bioremediation of Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and crude Oil by Fungal Consortium from West Coast of Karnataka, India. In *J Curr Micro App S* 5: 386:396.
- Raisman, D. J. S, Gonzalez D. 2008. Reproducción en los euscomycetes.
- Rajendran R, Sundaram SK, Sridevi B-V, Prabhavath P, Gopi V. 2012. Biodetoxification of azo dye containing textile effluent through adapted fungal strains. *J Env S Tech* 5: 29-41.
- Ramirez-Méndoza B, 2018. Efecto del bisfenol A sobre el crecimiento y actividad enzimática de *Aspergillus fumigatus* aislado de suelo contaminado. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

- Reyes-César A, Absalón AE, Fernández FJ, González JM, Cortés-Espinosa DV. 2014. Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World J Micro Biotech* 30: 999-1009.
- Reyes-Ocampo I, González-Brambila M y López-Isunza F. 2013. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Rev. Mex. Ingn. Quím.* 12, 41-56.
- Riquelme M, y Sánchez-León E. 2014. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 20, 27–33.
- Rojas JA y Hormaza A. 2014. Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca. *Cien Desa* 5: 197-205.
- Salame-Méndez A, Gómez-Olivares JL, Valencia-Quintana R, Castro-Campillo A, Ramírez-Pulido J, García-Suárez MD, Serrano H. 2010. Xenobióticos: una paradoja biomédica. *ciencia y tecnología de la UACJ*. 8:
- Santana F, Gracioso L, Karolski B, Baltazar M, Mendes M, Nascimento C, Perpetuo E. 2019. Isolation of Bisphenol A-Tolerating/degrading *Shewanella haliotis* Strain MH137742 from an Estuarine Environment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 189, 103-115.
- Saratale RG, Saratale GD, Kalyani DC, Chang JS, Govindwar SP. 2009. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. *Bior Tech* 100: 2493-2500
- Sharma K, Arora S. 2013. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. *Critical Reviews in Microbiology* 41(1): 52–60.
- Shaw B. D., Chung D. W., Wang C. L., Quintanilla L. A., Upadhyay S. 2011. A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol.* 115 541–546.
- Shi K, Liu Y, Chen P, Li Y. 2021. Contribution of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Laccase in Lignite Degradation by Mixed White-Rot Fungi. *Waste and Biomass Valorization.* 12, 3753–3763
- Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. 2011. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research.* 216871, 1-11.
- Signorile PG, Spugnini EP, Mita L, Mellone P, D'Avino A, Bianco M, Diano N, Caputo L, Rea F, Viceconte R, Portaccio M, Viggiano E, Citro G, Pierantoni R, Sica V, Vincenzi B, Mita

- DG, Baldi F, Baldi A. 2010. Pre-natal exposure of mice to Bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gene Com Endocrin* 18: 318-325
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19, 634-643.
- Sosa-García B, 2020. Selección de un consorcio fúngico aislado de suelos contaminados capaz de crecer en presencia de Bisfenol-A. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Taheri-Talesh N., Xiong Y., Oakley B. R. 2012. The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 7:e31218.
- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Takai Y, Taketani Y. 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr. J.* 51: 165–169.
- Takita O, Tanaka T, Ooi T, Kinoshita S, Le T, Trau L. 2005. Fungal biodegradation of bisphenol A and benzophenone. *Os U Know arch* 185-188.
- Tarantino G, Valentino R, Somma CD, D’Esposito V, Passaretti F, Pizza G, Savastano S. 2013. Bisphenol A in polycystic ovary syndrome and its association with liver spleen axis. *C Endo* 78: 447–453.
- Tokiwa Y, Suzuki T, Takeda K. 2009. Two Types of Lipases in Hydrolysis of Polyester. *Agricultural and Biological Chemistry* 52(8): 1937–1943.
- Torres- Hernández M, 2019. Crecimiento de *Aspergillus terreus* ATCC 10029 y biodegradación de bisfenolA por sus enzimas manganeso peroxidasas (Mn-P). Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Torres-García I, 2019. Efecto del bisfenol A sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 3357 y su producción de lacasas y manganeso peroxidasas crecido en fermentación sólida empleando un soporte inerte. Universidad Autónoma de Tlaxcala
- Torres-García J.L, Ahuactizin-Pérez M, Fernández FJ, Cortés-Espinosa D. 2021. Bisfenol A: un problema de carácter mundial y el uso de hongos como estrategia para su biorremediación. *Frontera Biotecnológica.* 9-14.
- Trivedi J y Chhaya U. 2021 Bioremediation of phenolic pollutant bisphenol A using optimized reverse micelles system of *Trametes versicolor* laccase in non-aqueous environment. *Biotech.* 11(297).

- Tuininga AR. 2005. Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. En: Dighton J, White JF, Oudemans P, editores. *The Fungal Community: Its organization and role in the ecosystem*. 265–283.
- Turco V, Potorti A, Mansour H, Dugo G, Bella G. 2020. Plasticizers and BPA in spices and aromatic herbs of Mediterranean areas. *Nat. Prod. Res.* 34(1), 87-92.
- U. S. Environmental Protection Agency. 2010. Bisphenol A Action Plan (CASRN 80-05-7). CA Index Name: Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene) bis-. 2010-3-29. Estados Unidos de América.
- Vandenberg L, Chahoud I, Heindel J, Padmanabhan V, Paumgartten R, Schoenfelder G. 2007. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118: 1055–1070.
- Vandenberg L, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons W. 2010. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Repro Toxic* 2: 139-177
- VerBerkmoes C, Deneef J, Hettich L, Banfield F. 2009. Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics. *Nature Reviews Microbiology* 7(3): 196–205.
- Vom Saal FS y Welshons WV. 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol-A. *Environ. Res.* 100: 50–76.
- Vom-Saal FS y Hughes C. 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of Bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Env H Pers* 8: 926–933
- Wang T, Li M, Chen B, Xu M, Xu Y, Huang Y, Lu J, Chen Y, Wang W, Li X, Liu Y, Bi Y, Lai S, Ning G. 2012. Urinary bisphenol A (BPA) concentrations associates with obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: E223–E227.
- Wariishi H, Akileswaran L, Gold M. 1988. Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral Characterization of the Oxidized States and the Catalytic Cycle. *Biochemistry.* 27 (14), 5365 – 5370.
- Wen C, Yuichi H, Masako S, Michihiko S, Nakahide KC, Akira H. 2005. Biodegradation of bisphenol a by fungi. *App Bioche and Biotech.* 3: 75-182.
- Wetherill YB, Petra CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE. 2002. The xenoestrogen BPA induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostate adenocarcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 7: 515–524.

- Witayakran S, Ragauskas A. 2009. Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. Adv. Synth. Catal. 351, 1187–1209
- Xiros C, Christakopoulos P. 2009. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. Biotechnol Biofuels 2, 4
- Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi H, Nakasugi O. 2011. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. Chem 42: 415–418
- Yu Q, Feng L, Chai X, Qiu X, Ouyang H, Deng G. 2019. Enhanced surface Fenton degradation of BPA in soil with a high pH. Chemosphere. 220, 335-343.
- Zaborowska M, Kucharski J, Wyzkowska J. 2018. Biochemical and microbiological activity of soil contaminated with o-cresol and biostimulated with *Perna canaliculus* mussel meal. Environ Monit Assess. 190-602
- Zafra G, Absalón AE, Anducho-Reyes MA, Fernandez FJ, Cortés-Espinosa DV. 2014. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. Chemosphere. 172: 120-126.
- Zafra G, Absalon AE, Cuevas MC, Cortés-Espinosa DV. 2015. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. W A Soil Pol 225: 1826.
- Zafra G, Absalón AE, y Cortés-Espinosa DV. 2017. Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs. Braz. J. Microbiol. 46(3), 937–941.
- Zhang J, Cooke GM, Curran IH, Goodyer CG, Cao X.-L. 2011. GC–MS analysis of bisphenol A in human placental and fetal liver samples. J of Chro B 879: 209–214.
- Zhou, Qian; Liao, James. 2009. Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy. Current Pharmaceutical Design, 15(5), 467–478.
- Zoeller T, Bansal R, Parris C. 2005. Bisphenol-A, an Environmental Contaminant that Acts as a Thyroid Hormone Receptor Antagonist *in Vitro*, Increases Serum Thyroxine, and Alters RC3/Neurogranin Expression in the Developing Rat Brain. Endocrin. 146(2), 607-612.

2. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Composición química del BFA - - - - -	9
Fig. 2. Sitio activo propuesto de lacasa CotA de <i>Bacillus subtilis</i> - - - - -	21
Fig. 3. Ciclo catalítico de Mn-P - - - - -	23
Fig. 4. Ciclo de vida de <i>Aspergillus</i> sp - - - - -	27
Fig. 5. Interacciones interespecíficas de hongos y definiciones. - - - - -	30
Fig. 6. Prueba de antagonismo hongo desafiado vs hongos desafiantes. - - - - -	39
Fig. 7. Porcentajes de inhibición de <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> Mn-P7, <i>A. flavus</i> 1V, <i>A. flavus</i> 2C, <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. terreus</i> , <i>A. terreus</i> ATCC10029 y <i>A. nidulans</i> en medio GYE (■), Czapek (■) y Toyamas (■)	45
Fig. 8. Figura 8. Velocidades de crecimiento de <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V, <i>A. flavus</i> 2C, <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP, <i>A. nidulans</i> en medio Toyamas adicionado con 0 (■), 50 (■), 100 (■), 200 (■), 300 (■), 400 (■) y 500 (■) ppm de BFA, respectivamente	46
Fig. 9. Figura 9. Porcentajes de inhibición de <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V, <i>A. flavus</i> 2C, <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP, <i>A. nidulans</i> en medio Toyamas adicionado con 0 (■), 50 (■), 100 (■), 200 (■), 300 (■), 400 (■) y 500 (■) ppm de BFA, respectivamente.	47
Fig. 10. Evaluación antagónica en ausencia de BFA de los hongos <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP, <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V.	51

<p>Fig. 11. Evaluación antagónica en presencia de 200ppm de BFA de los hongos <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP A, <i>A. nidulans</i>, <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V.</p>	53
<p>Fig. 12. Producción de CO₂ (mg/L) del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida.</p>	55
<p>Fig. 13. Producción de CO₂ acumulado (mg/L) del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆), y CO₂ calculado del tratamiento 1 (■) y 2 (●) crecido en fermentación sumergida.</p>	57
<p>Fig. 14. Perfiles de pH del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida</p>	58
<p>Fig. 15. Consumo de glucosa del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida</p>	59
<p>Fig. 16. Actividad enzimática de lacasas del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida</p>	60
<p>Fig. 17. Actividad enzimática de Mn-P del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 (●) y 4 (◆) crecido en fermentación sumergida</p>	62
<p>Fig. 18. Crecimiento del consorcio fúngico con el tratamiento 1 (■), 2 (●), 3 y 4 crecido en fermentación sumergida</p>	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Control de numeración de hongos - - - - -	30
	39
Tabla 2. Score de interacciones entre hongo-hongo para prueba cualitativa- - - -	
Tabla 3. Velocidad de crecimiento <i>A. niger</i> 321 <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> Mn-P7, <i>A. flavus</i> 1V, <i>A. flavus</i> 2C, <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. terreus</i> , <i>A. terreus</i> ATCC10029 y <i>A. nidulans</i> . En medio GYE, Czapek y Toyamas. - - - - -	43
	44
Tabla 4. Velocidad de crecimiento de <i>A. niger</i> 321 <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> Mn-P7, <i>A. flavus</i> 1V, <i>A. flavus</i> 2C, , <i>A. terreus</i> , <i>A. terreus</i> ATCC10029 y medio GYE, Czapek y Toyamas más 200mg/L de bisfenol-A.- - - - -	46
Tabla 5. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V, <i>A. flavus</i> 2C, <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP, <i>A. nidulans</i> en medio Toyamas adicionado con 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500ppm de BFA . - - - - -	49
Tabla 6. Porcentaje de antagonismo en ausencia de BFA de los hongos <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP A, <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V. - - - - -	52
Tabla 7. Porcentaje de antagonismo en presencia de 200ppm de BFA de los hongos <i>A. niger</i> 321, <i>A. niger</i> SCB, <i>A. niger</i> MnP A, <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> NRRL3357, <i>A. flavus</i> 1V. - - - - -	54
Tabla 8. Parámetros cinéticos de producción de CO ₂ del consorcio fúngico de <i>Aspergillus</i> con cuatro distintos tratamientos en fermentación sumergida. - - - - -	56

Tabla 9. Tabla 9. Parámetro cinético de producción enzimática máxima de lacasas por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con cuatro distintos tratamientos en fermentación sumergida. ----- 61

Tabla 10. Parámetro cinético de producción enzimática máxima de Mn-P por el consorcio fúngico de *Aspergillus* con cuatro distintos tratamientos en fermentación sumergida. ----- 62