



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**BIORREMEDIACIÓN DE ZONAS CONTAMINADAS POR
HIDROCARBUROS EMPLEANDO HONGOS COMESTIBLES:
EFECTO DEL ANTRACENO SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE
*PLEUROTUS OSTREATUS***

FRANCISCO JAVIER CAMACHO MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2013



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Francisco Javier Camacho Martínez**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Porfirio Morales Almora**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus***", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 18 de noviembre del 2013

Francisco Javier Camacho Martínez

Vo. Bo. Dr. Porfirio Morales Almora
Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: **Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus***, realizada por el alumno: **Francisco Javier Camacho Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

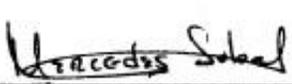
MAESTRO EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR: 
DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESORA: 
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR: 
M.C. VÍCTOR MANUEL MORA PÉREZ

Puebla, Puebla, México, 18 de noviembre del 2013

BIORREMEDIACIÓN DE ZONAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBUROS
EMPLEANDO HONGOS COMESTIBLES: EFECTO DEL ANTRACENO SOBRE
EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *PLEUROTUS OSTREATUS*

Francisco Javier Camacho Martínez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

En la producción de hongos comestibles se utilizan diversos residuos agroindustriales como la paja de cebada, trigo y avena. Como resultado del cultivo, se producen grandes cantidades de sustrato residual, el cual puede potencialmente ser usado para procesos de biorremediación *in situ*. En el presente estudio, se cultivó el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (CP-50) en presencia del hidrocarburo aromático policíclico, antraceno. La cepa se cultivó en tres condiciones: 1) Agar con Extracto de Malta (EMA), CP-50 y antraceno (tratamiento); 2) EMA y CP-50 (testigo) y 3) EMA y antraceno (blanco). Se utilizaron 4 concentraciones de antraceno por caja Petri (0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 g). A cada muestra se le midió el área de la colonia (cm^2), se determinó la cantidad de proteína, actividad volumétrica de las enzimas lacasas y un gel de poliacrilamida (PAGE). La mejor colonización fue en la condición con 0.05 g de antraceno, tanto en el testigo como el tratamiento a los 17 días con un área de 62.70 cm^2 , mientras que el tratamiento fue de 58.34 cm^2 . La mayor producción de proteína fue con 0.05 g de antraceno con $53.90 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el tratamiento, mientras que en el testigo fue de $49.91 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que representó un 7.41% más. La mayor producción de lacasas se obtuvo en 0.4 g en el tratamiento con 32.67 U mL^{-1} , mientras que el testigo fue de 25.07 U mL^{-1} , lo que representó un 23.27% más de enzimas. Se detectó la presencia de una isoenzima de lacasa en todas las condiciones usadas, tanto en el testigo como en el tratamiento en la toma de muestra, antes y después del contacto. Sin embargo, la aparición de una segunda isoenzima se presentó sólo en la condición de la colonización completa en presencia de antraceno. En base a los resultados, se propone una estrategia para el manejo y aplicación potencial de hongos comestibles productores de lacasas, en procesos de biorremediación *in situ* suelos contaminados con hidrocarburos.

Palabras clave: Antraceno, lacasas, PAGE, *Pleurotus ostreatus*, proteínas.

BIOREMEDIATION OF OIL-CONTAMINATED AREAS USING EDIBLE
MUSHROOMS: EFFECT OF ANTHRACENE ON THE *IN VITRO* GROWTH OF
PLEUROTUS OSTREATUS

Francisco Javier Camacho Martínez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Production of edible mushrooms uses various agro-industrial residues such as, straw of barley, wheat and oats. As a result of the cultivation, large amounts of residual substrate are produced, which can be used for bioremediation. In the present study, the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (CP- 50) was cultured in presence of the polycyclic aromatic hydrocarbon, anthracene. The strain was grown in three conditions: 1) Malt Extract Agar (EMA), CP -50 and anthracene (treatment), 2) EMA and CP- 50 (control) and 3) EMA and anthracene (white). 4 concentrations were used per Petri dish anthracene (0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 g). Each sample was measured in colony area (cm²), determined the amount of protein, volumetric activity of laccases and a polyacrylamide gel (PAGE). The best colonization was achieved in the condition with 0.05 g of anthracene, both in the control and treatment at 17 days with an area of 62.70 cm², while the treatment was 58.34 cm². The protein yield in the condition with 0.05 g of anthracene was 53.90 µg mL⁻¹ in the treatment, while in the control was 49.91 µg mL⁻¹, which accounted for 7.41%. The highest production of laccase was obtained in the treatment with 0.4 g, producing 32.67 U mL⁻¹, while the control was 25.07 U mL⁻¹, which represented a 23.27 % increase. The presence of a laccase isoenzyme in all the conditions used was detected, both in the control and treatment in the sample before and after contact. However, the emergence of a new isozyme was present only in the condition of complete colonization in the presence of anthracene. Based on the results, we propose a strategy for the management and application of edible fungi producing laccase in bioremediation processes in situ soils contaminated with hydrocarbons.

Key words: Anthracene, laccases, PAGE, *Pleurotus ostreatus*, proteins.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México a través del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haber financiado mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla durante el período 2011-2013.

A Dios por darme vida, salud y una hija hermosa quien me motiva en todo momento a escalar un peldaño más en la vida para crecer profesionalmente y como persona.

A mis queridos padres Eduardo y Alicia por todo su amor, su confianza y su apoyo. Han sido parte fundamental para completar mis estudios y sin ellos jamás hubiera sido posible.

A mis queridos hermanos por estar conmigo y, contar siempre con su apoyo incondicional.

En especial a los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales, profesores, académicos y alumnos, por hacer una grata instancia durante mi fase experimental.

A la Línea Prioritaria de Investigación, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal expreso mi más sincero agradecimiento, por brindarme parte de los insumos que utilicé durante la realización de este trabajo de investigación.

A todos los amigos y compañeros con los que tuve la fortuna de convivir durante los dos años de mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados. Gracias por los grandes momentos que estuvimos juntos.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 Hidrocarburo aromático policíclico	8
2.2 Impacto social	8
2.3 Importancia	9
2.4 Biorremediación	10
2.5 Atenuación natural	11
2.6 Ejemplos de biorremediación	11
2.7 Basidiomycetes	13
2.8 <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
2.9 Proteínas	14
2.10 Enzimas	15
2.11 Lacasas	15
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivo particular	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 Material biológico	20
6.2 Medio de cultivo	20
6.3 Condiciones experimentales	20
6.3.1 Esterilización del papel celofán y su colocación en la caja Petri	20
6.3.2 Adición del antraceno a las cajas Petri	21
6.3.3 Inoculación de las cajas Petri	21
6.3.4 Tratamientos y variables	22
6.3.5 Imagen de las cajas Petri con los tratamientos	22
6.4 Determinación del área con el programa <i>Image J</i>	23
6.4.1 Procesamiento de los datos obtenidos en el programa <i>Image J</i>	23
6.5 Obtención del sobrenadante de las muestras	23
6.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford	30
6.7 Determinación de la actividad volumétrica de las lacasas	31
6.8 Determinación de la actividad de lacasas en gel de Electroforesis Nativa (PAGE)	33
6.8.1 Concentración de muestras para prueba de Electroforesis Nativa (PAGE)	33
6.8.2 Preparación del gel para Electroforesis Nativa (ND-PAGE)	33
6.9 Análisis estadístico	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Determinación del área de crecimiento	38
7.2 Contenido de proteína	42
7.3 Producción de lacasas	46
7.4 Gel de Electroforesis Nativa (PAGE)	51

8. CONCLUSIONES	55
9. ESTRATEGIA PARA EL MANEJO Y APLICACIÓN DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCTORES DE LACASAS, EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN <i>IN SITU</i>, DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	56
9.1 Introducción	56
9.2 Actores de la estrategia	57
9.3 Estrategia manejo y aplicación de las cepas biorremediadoras	58
10. LITERATURA CITADA	61
11. ANEXOS	64
11.1 Determinación del área por medio del programa <i>IMAGE J</i>	64
11.2 Procedimiento para la determinación de proteína por el método Bradford.....	65
11.3 Lectura al EPOCH para la determinación volumétrica de lacasas.....	69
11.4 Elaboración del gel de poliacrilamida nativo	71
11.5 Preparación de frascos de cristal	72
11.5.1 Siembra de frascos de cristal	73
11.6 Resultados de inducción a fructificación	74

Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación del petróleo e hidrocarburos (Lesser & Saval, 2001).	4
Figura 2. Representación del metabolismo del benzopireno en humanos.	6
Figura 3. Papel de la enzima lacasa oxidando sustratos no habituales por la acción de los mediadores redox (A), y los potenciales redox de las reacciones de oxidación de ABTS y HBT por lacasa (B). (Kunamneni <i>et al</i> 2008).	16
Figura 4. Metodología general de la investigación realizada en el presente trabajo.	19
Figura 5. Forma en que se coloca el papel celofán y el antraceno en la caja Petri con medio de cultivo solidificado. El lugar donde está colocado el celofán es donde se inoculará la cepa de <i>P. ostreatus</i>	21
Figura 6. Lugar donde se colocó el inóculo de las cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> . Caja con antraceno (izquierda), caja testigo, sin antraceno (centro) y caja con antraceno no inoculado o blanco (derecha).	22
Figura 7. Lugares de las cajas Petri donde se realizaron la toma de las muestras en las tres condiciones experimentales. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en base a los tiempos esperados en las referencias.	25
Figura 8. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.05 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.	26
Figura 9. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.1 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.	27
Figura 10. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.2 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.	28
Figura 11. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.4 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.	29
Figura 12. Forma como se agregan los reactivos para la determinación de las lacasas con ayuda de una pipeta multicanal con ocho puntas.	32

Figura 13. Esquematización del procedimiento para la determinación de la actividad volumétrica de lacasas.....	32
Figura 14. Crecimiento de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.05 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	36
Figura 15. Crecimiento de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.1 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	36
Figura 16. Crecimiento de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.2 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	37
Figura 17. Crecimiento de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.4 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	37
Figura 18. Crecimiento micelial en cm ² de las colonias de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en el testigo y tratamiento (0.05 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	38
Figura 19. Crecimiento micelial en cm ² de las colonias de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en el testigo y tratamiento (0.1 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	39
Figura 20. Crecimiento micelial en cm ² de las colonias de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en el testigo y tratamiento (con 0.2 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	40
Figura 21. Crecimiento micelial en cm ² de las colonias de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> en el testigo y tratamiento (con 0.4 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.....	41

- Figura 22.** Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.05 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.42
- Figura 23.** Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.1 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.43
- Figura 24.** Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.2 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.44
- Figura 25.** Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.4 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.45
- Figura 26.** Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.05 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.46
- Figura 27.** Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.1 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.47
- Figura 28.** Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.2 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.48
- Figura 29.** Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.4 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.49
- Figura 30.** Patrón electroforético de lacasas producidas por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, tomando como referencia el Testigo (1= sin antraceno) y comparándolo con el tratamiento (2= con antraceno) con respecto a cada

concentración de antraceno (A = 0.05, B = 0.1, C = 0.2 y D = 0.4 g de antraceno). Los signos (- y +) se describen en la Figura 4.....	52
Figura 31. Ejemplo de las herramientas del programa <i>Image J</i> . Al fondo se observa la cepa 50 después del punto de encuentro con el antraceno.	65
Figura 32. Placa de 96 pozos para lectura al espectrofotómetro, donde se ejemplifica los colores que se pueden observar al agregar las muestras y el colorante.	67
Figura 33. Figura de la forma de agregar el sustrato ABTS con ayuda de la micropipeta multicanales, del pozo A al H; por columna.	69
Figura 34. Figura para hacer la lectura de nuestras muestras con el espectrofotómetro. a) Abrir el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la máquina con el nombre de “protocolo para lacasas”. b) Abrir un nuevo experimento a partir de la pestaña “file”. c) Seleccionar el protocolo con el que se va a trabajar, en este caso sería “lacasses”. d) Presionar el botón de “run ensay”, este botón lo encuentran en la parte superior con el símbolo de una flecha color verde que apunta hacia la izquierda.....	70
Figura 35. Fructificación en frascos con medio de cultivo EMA y 0.05 g de antraceno.	74
Figura 36. Fructificación en frascos con medio de cultivo CYM y 0.05 g de antraceno.	75

Lista de tablas

Tabla 1. Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	5
Tabla 2. Diferentes enzimas lignocelulíticas detectadas en medio de cultivo en fase sólida (SMS), por hongos comestibles (Phan y Sabaratham, 2012).....	7
Tabla 3. Cantidades de BSA (Albúmina sérica bovina Sigma) que se agregan al agua destilada estéril para la construcción de la curva de calibración a partir de una solución Stock de $500 \mu\text{g ml}^{-1}$	30
Tabla 4. Cantidades de reactivos que se agregan para elaborar el gel de poliacrilamida nativo de acuerdo al porcentaje requerido.....	34
Tabla 5 Producción de proteína, lacasas y área de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en las diferentes concentraciones de antraceno, cultivado en cajas de Petri con medio extracto de malta agar (EMA).	50
Tabla 6. Matriz de objetivos y actividades para desarrollar la estrategia.	58
Tabla 7. Causas y efectos del problema central identificado.	59
Tabla 8. Matriz de análisis FODA.	60
Tabla 9. Curva de calibración con BSA concentración $500 \mu\text{g}$ $500 \mu\text{l}$	66
Tabla 10. Relación de reactivos que se utilizan en g para preparar medio de cultivo enriquecido CYM.....	72

1. INTRODUCCIÓN

Por definición la real academia española, prescribe a la agricultura como el conjunto de técnicas y conocimientos para cultivar la tierra. Comprende todo un conjunto de acciones humanas que transforma el medio ambiente natural para obtener un beneficio personal. Todas las actividades económicas que abarca dicho sector tienen su fundamento en la explotación de los recursos que la tierra origina, favorecida por la acción del hombre: alimentos vegetales como cereales, frutas, hortalizas, pastos cultivados y forrajes; fibras utilizadas por la industria textil; cultivos energéticos y tubérculos, entre otros.

En base al Octavo Censo Agrícola, Ganadero y Forestal realizado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI, 2007), menciona que el estado de Puebla cuenta con 2 millones 520 mil 411 hectáreas productivas. De las cuales 1 millón 22 mil 927 hectáreas se usan para tierras de labor. Dentro de los productos primarios que se obtienen a partir de estas tierras para brindar un beneficio social, 15.60 millones de toneladas, corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café. A partir de décadas pasadas se ha visto un interés por los investigadores en hacer uso a estos sub productos agrícolas (Martínez-Carrera *et al*, 2010).

Por otro lado, nuestro país posee una gran diversidad de hongos que crecen en forma silvestre y otros en forma dirigida, tal es el caso de las “setas” (*Pleurotus ostreatus*) y “champiñones” (*Agaricus bisporus*). Estos organismos tienen la característica de crecer sobre productos secundarios de las actividades agrícolas, lo que nos conlleva a un uso a los desechos agroindustriales de forma eficiente (Martínez-Carrera *et al*, 2010).

Del resto de las hectáreas disponibles se cataloga 1 millón 438 mil 808 hectáreas solo con pasto no cultivado, sólo 42 mil 604 hectáreas pertenecen a bosques o selva; 16 mil 71 hectáreas carecen de vegetación alguna, de las cuales 13 mil 877 son pedregales y arenales; 203 hectáreas están ensalitradas y 1,207 están completamente erosionadas ya sea por desastres naturales o por desastres antropogénicos.

Dentro del millón doscientos siete hectáreas erosionadas, un porcentaje corresponde a casos antropogénicos, dentro los primordiales encontramos derrames de petróleo. En los últimos años, el mal uso de los materiales y residuos peligrosos producidos por las grandes industrias, han generado un problema de contaminación tóxica en suelos, aire y agua. A la par se ha formado una conciencia en la sociedad sobre la importancia de este tema, ya que se pueden ver afectados espacios terrestres. En México, el transporte de petróleo crudo y sus derivados como los que podemos observar en la **Figura 1**, se ha visto afectado durante los últimos 18 años, por una actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones petroleras, mejor conocido como la ordeña clandestina de óleos (Mazzocco-Sepezzia, 2012). Normalmente en los lugares donde se llevan a cabo estas acciones, afectan determinadas áreas terrestres, por medio del derramamiento de estos productos al suelo. Al interactuar los hidrocarburos con suelos terrestres van a causar una intoxicación del suelo, provocando una disminución parcial o total de la vegetación por la erosión del mismo.

La erosión de un suelo va afectar de manera económica a una pequeña sociedad, debido a que reduce su nivel económico al disminuir su cosecha por este fenómeno. La siguiente investigación se va inclinar a un tema de importancia científico-social que tenga como beneficio factores a favor de una comunidad con una problemática. Según Soriano (2004), menciona que una investigación se va a ver afectada por los intereses personales del investigador o de su director de proyecto, por lo que se desea, no perturbar el objetivo a seguir. Con esta investigación se busca una propuesta que beneficie a una comunidad.

Antes de iniciar nuestra investigación se justifica el por qué se realiza dicha investigación, y ver si en realidad es un problema para la comunidad y determinar que la problemática de la investigación gira entorno de los hidrocarburos. Al validar la importancia de la investigación se procederá con seguridad a obtener resultados confiables para realizar la propuesta que beneficie a una sociedad (Silva, 2003). Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. La estructura molecular consiste en un armazón de átomos de carbono a los que se unen los átomos de hidrógeno. Las cadenas de átomos de carbono pueden ser lineales o ramificadas, abiertas o cerradas (**Figura 1**). Los hidrocarburos se pueden clasificar en dos tipos, que son alifáticos y aromáticos. A su vez los hidrocarburos alifáticos se pueden clasificar en alcanos, alquenos y alquinos esto va a depender del número de enlaces con los que cuenta (Andersson *et al.*, 2003).

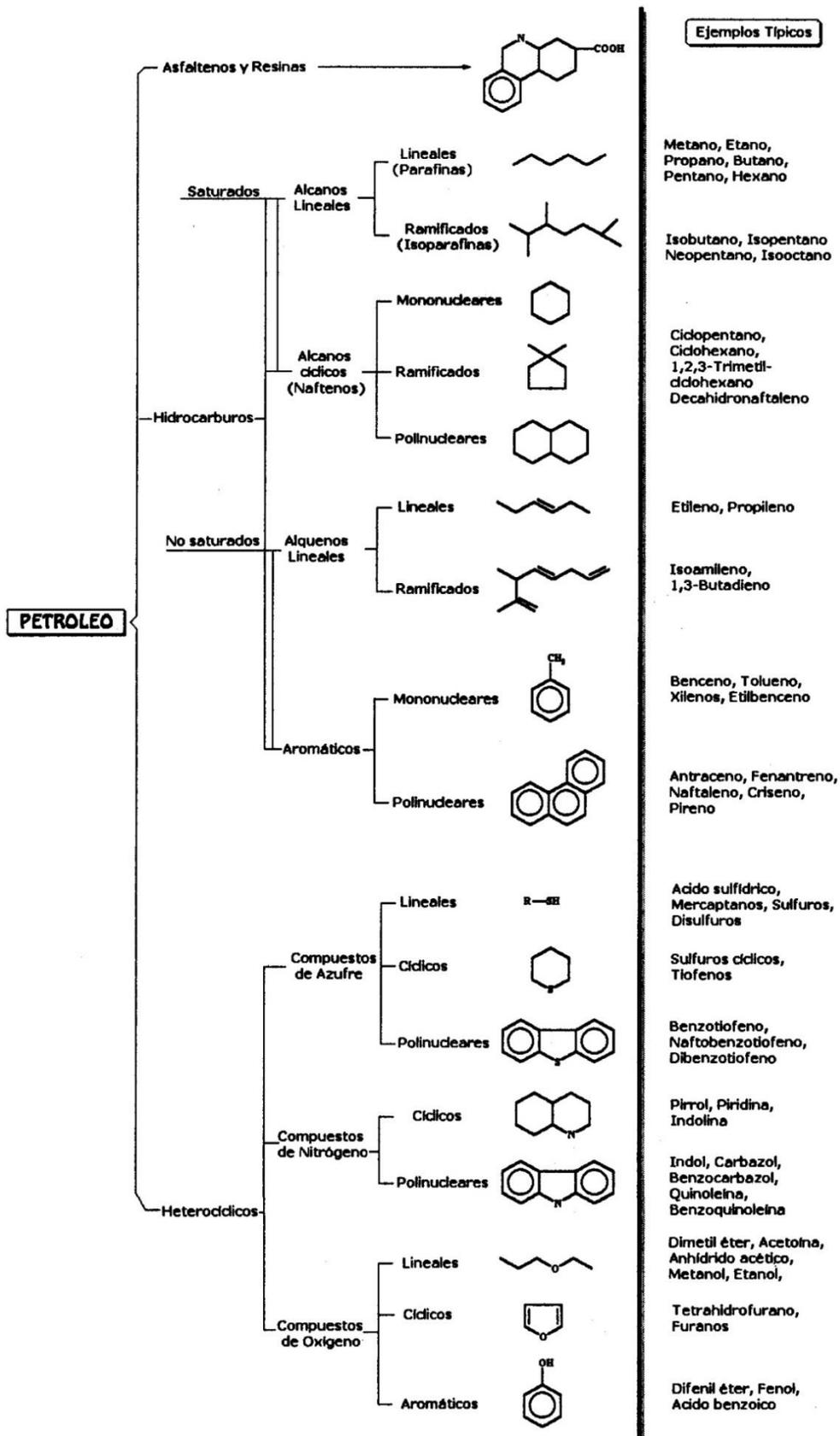


Figura 1. Clasificación del petróleo e hidrocarburos (Lesser y Saval, 2001).

En el caso de nuestra investigación se trabaja con hidrocarburos aromáticos. Un hidrocarburo aromático es un compuesto orgánico cíclico conjugado que cumple la regla de Hückel, es decir, que tienen un total de $4n+2$ electrones π en el anillo que a su vez lo hace tener la característica de ser un compuesto resonante (**Figura 1**). Los HAP se encuentran generalmente como mezclas complejas, no como compuestos simples. Existen más de 100 clases diferentes de HAP. Típicamente, la exposición a los HAP raramente es de forma individual. En la **Tabla 1** se mencionan los HAP más comunes.

Tabla 1. Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Lesser y Saval, 2001).		
Nombre común	Número CAS*	Nombre CAS*
Acenafteno	83-32-0	Acenaftileno
Acenaftileno	208-96-9	1,2-Dihidro-acenaftileno
Antantreno	191-26-4	Dibenzo[d,e,f,m,n,o]criseno
Antraceno	120 ¹ 2-7	Antraceno
Benzo[a]antraceno	56-55-3	Benzo[a]antraceno
Benzo[a]pireno	50-32-8	Benzo[a]pireno
Benzo[e]pireno	192-91-2	Benzo[e]pireno
Benzo[b]fluoranteno	205-99-2	Benzo[e]acefenantrileno
Benzo[g,h,i]perileno	191-22-4	Benzo[g,h,i]perileno
Benzo[j]fluoranteno	205-82-3	Benzo[j]fluoranteno
Benzo[k]fluoranteno	207-08-9	Benzo[k]fluoranteno
Ciclopenta[c,d]pireno	27208-37-3	Ciclopenta[c,d]pireno
Criseno	218-01-09	Criseno
Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-03	Dibenzo[a,h]antraceno
Fluoranteno	206-44-0	Fluoranteno
Fluoreno	86-73-7	9H-fluoreno
Fenantreno	85-01-8	Fenantreno
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	193-39-5	Indeno[1,2,3-c,d]pireno
Naftaleno	91-20-3	Naftaleno
Pireno	129-00-0	Pireno

(*) CAS: el número registrado CAS es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones. Llamado también CAS RN (en inglés CAS registry number). CAS es el acrónimo de Chemical Abstracts Service, una división de la Sociedad Americana de Química, que asigna estos identificadores a cada compuesto químico que ha sido descrito en la literatura.

La aromaticidad puede incluso extenderse a sistemas policíclicos, como el naftaleno, antraceno, fenantreno y otros más complejos, incluso ciertos cationes y aniones, como el pentadienilo, que poseen el número adecuado de electrones π y que además son capaces de crear formas resonantes (Iglesias-Groth *et al.*, 2010). Químicamente, los hidrocarburos aromáticos son compuestos por regla general bastante inertes a la sustitución electrófila y a la hidrogenación, reacciones que deben llevarse a cabo con ayuda de catalizadores (Iglesias-Groth *et al.*, 2010).

Una vez que los HAP se encuentran dentro del cuerpo humano, tienden a distribuirse en los órganos con mayor contenido graso, sin embargo, no tienden a acumularse en el organismo, y la mayoría de ellos son eliminados a los pocos días de su absorción, principalmente por la orina y las heces (Agudo, 2010). Como con cualquier sustancia externa, el organismo trata de eliminarla, mediante un proceso que se conoce como detoxificación, y que se realiza mediante un complejo enzimático. Como se muestra en la **Figura 2**.

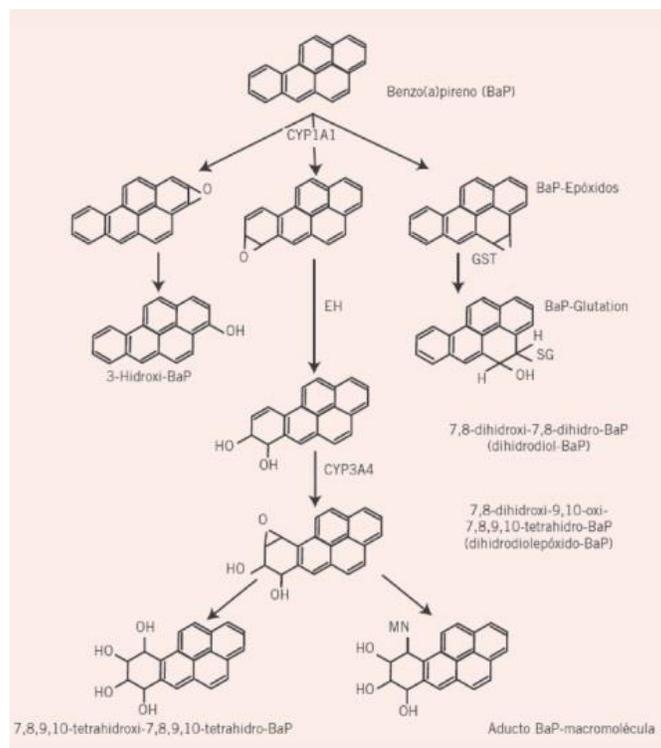


Figura 2. Representación del metabolismo del benzopireno en humanos. Las abreviaturas corresponden a las enzimas que catalizan las transformaciones del benzo [a] pireno en sus diferentes metabolitos: CYP1A1, CYP3A4: enzimas 1A1 y 3A4 del citocromo P450. EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutation-S-Transferasa (Agudo, 2010)

En los últimos años ha surgido una nueva propuesta para la recuperación de espacios contaminados, esto con ayuda de agentes biológicos llamado biorremediación. En el trabajo realizado por Mazzocco-Spezia, (2012) menciona que una forma de biorremediar un espacio contaminado es por medio de la reincorporación de sustrato gastado en técnicas de cultivo de hongos comestibles, al suelo contaminado con hidrocarburos, ya que en la mayor parte de este residuo lleva implícito un complejo enzimático (**Tabla 2**) con potencial de eliminar o transformar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Phan y Sabaratham, 2012).

Tabla 2. Diferentes enzimas lignocelulolíticas detectadas en medio de cultivo en fase sólida (SMS) por hongos comestibles (Phan y Sabaratham, 2012).

Enzima	Nombre comercial	Hongo	Componente del SMS	Referencia
α -Amylase	EC 3.2.1.1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Aserrín	Ko <i>et al.</i> (2005)
Cellulase	EC 3.2.1.4			
β -Glucosidase	EC 3.2.1.21	<i>Lentinula edodes</i>		
Laccase	EC 1.10.3.2	<i>Flammulina velutipes</i>		
Xylanase	EC 3.2.1.8	<i>Hericium erinaceum</i>		
Lignin peroxidase	EC 1.11.1.14	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Aserrín, sago hampas from sago palm (<i>Metroxylon sagu</i>)	Kumaran <i>et al.</i> (1997) Singh <i>et al.</i> (2003)
Cellulase	EC 3.2.1.4			
β -Glucosidase	EC 3.2.1.21			
Laccase	EC 1.10.3.2			
Xylanase	EC 3.2.1.8			
Xylan-degrading enzymes	Endoxylanase 6-Xylosidase Arabinofuranosidase Acetylerase	Commercial SMS	Paja de trigo	Ball y Jackson (1995)
Cellulose-degrading enzymes	Endoglucanase			
	Cellobiosidase			
	β -Glucosidase			
Lignin-degrading enzymes	Peroxidase Phenol oxidase			
Laccase	EC 1.10.3.2	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>		Martínez-Carrera <i>et al.</i> , (2010) Mayolo-Deloisa <i>et al.</i> (2009)

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Hidrocarburo aromático policíclico

Literalmente Byss *et al.* (2008), mencionaron que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes tóxicos que se han acumulado en el medio ambiente debido a una variedad de actividades humanas. Los HAP son también componentes importantes de la creosota: alrededor del 85% está compuesto por HAP, mientras que los hidrocarburos aromáticos heterocíclicos y compuestos fenólicos también están presentes. A pesar de que los HAPs son persistentes en el medio ambiente (baja solubilidad en agua y la rápida asociación con la materia orgánica en los suelos produciendo sedimentos). Los posibles destinos de los HAP incluyen la volatilización, la foto-oxidación, oxidación química, la bioacumulación, la adsorción a las partículas del suelo o de los sedimentos, la lixiviación y degradación microbiana (Byss *et al.*, 2008).

2.2 Impacto social

Uno de los recursos que económicamente ha magnificado la economía mexicana ha sido el petróleo, pero el tipo de explotación y manejo que se le ha dado a sus instalaciones y oleoductos ha desencadenado un sinnúmero de derrames de hidrocarburos, que han tenido un impacto negativo al medio ambiente. Entre los daños ocasionados se cuenta con la contaminación de los suelos, incluyendo aquellos donde realizan actividades agrícolas las poblaciones rurales. Las zonas con mayor exposición a este tipo de siniestros se encuentran ubicadas en regiones con altos niveles de marginación y pobreza y la agricultura practicada es de tipo campesino (Pardo-Castro *et al.*, 2004).

Uno de los problemas ambientales más importantes para México son los siniestros de tipo antropogénicos, sobresaliendo entre estos los derrames de hidrocarburos. Por otro lado, esos siniestros por derrames de hidrocarburos son letales al ambiente cuando se infiltran en el subsuelo debido fundamentalmente a que desaparecen los microorganismos benéficos y el suelo se impermeabiliza al no penetrar el aire y los nutrientes, además de afectar los minerales del sustrato de la tierra (Hestbjerg *et al.*, 2003).

La presencia de contaminantes en ciertos niveles implica múltiples consecuencias negativas para el medio ambiente y con un impacto directo a la especie animal, vegetal y humana (Benavides-López *et al.*, 2006).

2.3 Importancia

El derramamiento de hidrocarburos pareciera que tuviera pocas consecuencias con respecto a la agricultura, ya que esta no presenta grandes extensiones de contaminación en superficies agrícolas. Sin embargo, los hidrocarburos pueden interaccionar con mantos acuíferos subterráneos, afectando de ésta manera la salud animal y vegetal de sus alrededores (Hestbjerg *et al.*, 2003).

El tema de investigación se eligió debido a la importancia ecológica que desenvuelve todo el ámbito social agrícola. Ya que este tema aparentemente es superficial y a gran rasgo no importante, sin embargo dándole otro enfoque, se busca recuperar un espacio contaminado en porciones relevantes. Tomando en cuenta que estos espacios contaminados pueden provocar una pérdida en la flora y fauna terrestre, dando como resultado un suelo inútil para la agricultura. De ésta manera, se verá afectado el propietario del espacio, por lo tanto se pone en riesgo la seguridad alimentaria de su comunidad (Silva, 2003).

Los hongos se alimentan principalmente de materia muerta (compuestos orgánicos), de plantas y de animales, dando como resultado productos que pueden tener uso agroindustrial. Por lo tanto, los hongos poseen un papel ecológico muy relevante en los ciclos biogeoquímicos (Lee *et al.*, 2001). En la presente investigación se analizó la especie comestible *Pleurotus ostreatus* como una alternativa saludable; frente a la disminución de la calidad del medio ambiente por la interacción de hidrocarburos con espacios agrícolas.

2.4 Biorremediación

El término biorremediación se refiere al rescate con tecnologías biológicas de un espacio contaminado por una fuente ajena al medio. Los microorganismos ideales son los que cuentan con sistemas enzimáticos altamente eficientes como las peroxidasas y/o fenoloxidasas para lograr mineralizar los compuestos tóxicos sin dejar intermediarios tóxicos, a fin de no ocasionar daños posteriores en el ambiente (Benavides-López *et al.*, 2006). Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de microorganismos como plantas, hongos y bacterias, por nombrar a los principales. Estas a su vez pueden ser de procedencias naturales o modificadas genéticamente, para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (Cunninghama *et al.*, 2004).

La biorremediación *in situ* es la más aplicada, utiliza microorganismos autóctonos, estos en el suelo pueden degradar un gran número de constituyentes de lodo pero su eficacia y su población se ve afectada cuando algunos contaminantes tóxicos están presentes en altas concentraciones (Ander y Messner, 1998).

Según Ruiz-Herrera, (2001), menciona que el éxito que se busca alcanzar cuando se utiliza un microorganismo está en base a sus rutas metabólicas, las cuales se clasifican con respecto a una de las dos fases que pueden tener los microorganismos; aerobia o anaerobia. Los hidrocarburos del petróleo, entre otros contaminantes orgánicos, están sujetos al metabolismo aerobio, debido a la mineralización que se lleva a cabo en este estado para obtener productos inorgánicos. Las enzimas que realizan el mecanismo de transformación de los n-alcanos son: mono y dioxigenasas que como su nombre lo dicen requieren de la interacción del oxígeno para que puedan actuar, las primeras enzimas incorporan un átomo de oxígeno en los alcanos y lo transforma, reduciéndolo a una molécula de agua (H₂O) (Ander y Messner, 1998).

2.5 Atenuación natural

Para enriquecer esta investigación fue necesario recurrir a distintas teorías de recuperación de espacios contaminados. Estas teorías se engloban en reacciones físicas, químicas y biológicas. Interactuando mutuamente o por sí solas. Un claro ejemplo de la sinergia de éstas es la atenuación natural, esta técnica consiste en los procesos físicos, químicos y biológicos que se llevan a cabo simultáneamente en un sitio contaminado ya sea *in situ* o *ex situ* (en el espacio de origen o fuera del espacio de origen) (Lee *et al.*, 2001; Caramelo *et al.*, 2004). Por otro lado, una parte del suelo está conformado por materia orgánica, y esta materia es la suma de los microorganismos que acobija la misma naturaleza.

Los hongos son organismos eucariontes capaces de transformar compuestos xenobióticos, todo esto gracias a la capacidad para mineralizar, humificar materia orgánica disponible y transformar compuestos orgánicos a partir de sus ciclos biogeoquímicos (Mougin, 2002). La atenuación natural, es una técnica de biorremediación mayormente aplicada *in situ* de bajo costo, su característica principal es la utilización de los procesos fisicoquímicos de interacción contaminante-suelo, y los procesos de biodegradación tienen lugar de forma natural. Estos procesos se conocen como procesos de biotransformación natural, que van a reducir la concentración de los contaminantes. Entre ellos se encuentra la dilución, dispersión, volatilización, adsorción, biodegradación y las reacciones químicas que se producen en el suelo (Lee *et al.*, 2001).

2.6 Ejemplos de biorremediación

Un claro ejemplo es en el que se utilizó una mezcla de tres especies fúngicas: *Alternaria alternata*, *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*, las que fueron cultivadas con los desechos de barros durante 30 días en condiciones de laboratorio. Los resultados de los análisis cromatográficos indican que la fracción aromática de la mezcla de hidrocarburos presentes en los barros utilizados, ha tenido una importante degradación (Cunningham *et al.*, 2004). En Long Beach (California), aplicaron la biorremediación *in situ* en suelo contaminado con aceite diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos,

complementada con la adición de nutrientes y oxígeno en el suelo “bioestimulación”, e inoculación de una mezcla enriquecida de consorcios fúngicos previamente extraída del mismo suelo “bioaumentación” (Benavides-López *et al.*, 2006).

La justificación que se ha venido manejando, es en base a la magnitud, trascendencia, factibilidad y vulnerabilidad del problema, y las causas de éste en el ámbito social. El uso de las isoenzimas provenientes de *Pleurotus eryngii* son una buena opción para la biorremediación de espacios contaminados con antraceno (Caramelo *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 1996). Similares resultados obtuvo Hestbjerg *et al.*, (2003), quien trabajó con suelo contaminado con hidrocarburos, disminuyendo su grado de toxicidad por medio de la cepa *Pleurotus ostreatus*, teniendo buenos resultados en la producción de lacasas. Utilizando el mismo organismo Andersson *et al.*, (2003), unifico la opinión del resultado de las lacasas provenientes de la interacción con suelos contaminados con HAPs; haciendo mención que la degradación que se lleva a cabo es una secuencia de rutas metabólicas donde, con ayuda de H₂O₂ ayuda a la descomposición de los enlaces entre las macromoléculas. Finalmente, Ander y Messner (1998), mencionan que el éxito de la oxidación de los HAPs es la interacción de un complejo enzimático de LiP, MnP y lacasas. Quien obtuviera resultados prometedores al utilizar *Pycnoporus* y *Trametes versicolor*. Este último de igual forma se ha estudiado y demostrado una gran producción de lacasas y cinabarina (Martínez-Carrera *et al.*, 2010; Placková *et al.*, 2012).

Para que los hongos puedan llevar a cabo la biotransformación son necesarios una serie de tres procesos: Biodegradación, cometabolismo y la síntesis. En el primer proceso se realiza la ruptura completa de una molécula de un tamaño considerable. El cometabolismo se refiere a las pequeñas modificaciones de la estructura de los compuestos xenobióticos, y que otros organismos pueden utilizar como sustrato de crecimiento. En el proceso de síntesis básicamente los compuestos xenobióticos son transformados en compuestos químicos con estructuras más complejas. Unos ejemplos de estos

compuestos pueden ser cualquier compuesto ya sea metilados como acetilados o alquilados, glucósidos, o conjugación de aminoácidos.

Un estudio realizado por Matsubara *et al.*, (2006) demostraron que nueve cepas de hongos de la podredumbre blanca, podría degradar fenantreno y pireno dentro las especies mencionadas se encuentra *Pleurotus ostreatus*, quien demostrará una capacidad prometedora para remediar sitios contaminados con hidrocarburos policíclicos.

2.7 Basidiomycetes

Los basidiomycetes son un grupo de hongos de los más diversos, formado por unas 20,000 especies entre las cuales se encuentran las conocidas setas, los bejines, falos, hongos de la madera, las royas y carbones. Entre todos forman aproximadamente el 30 % de los hongos conocidos. Su principal característica es formar basidios, meiosporangios productores de basidiosporas exógenas, uninucleadas y haploides (Ruiz-Herrera, 2001).

2.8 *Pleurotus ostreatus*

Este hongo es fácilmente reconocible por la forma en que crece sobre la madera su tamaño relativamente grande, sus láminas blanquecinas que corren por un estípote casi ausente, y su esporada de color blanquecino a lila. Fructifica en otoño y en invierno, en América del Norte, y cuenta con un píleo que va de color blanco a marrón. Un número de especies muy similares están estrechamente relacionados, y el término amplio "Hongo Ostra" se aplica por igual a *Pleurotus ostreatus* (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

Ecología: es un hongo saprobio, que crece en racimos sobre troncos muertos y árboles vivos (principalmente maderas duras, pero a veces en coníferas), causando una pudrición blanca. A finales del invierno y principios de primavera, es muy común, y se encuentra ampliamente distribuido en América del Norte. Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, con un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

2.9 Proteínas

Las proteínas son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Las proteínas son indispensables para la vida, sobre todo por su función plasmática (constituyen el 80% del protoplasma deshidratado de toda célula), pero también por sus funciones biorreguladoras (forman parte de las enzimas) y de defensa (los anticuerpos son proteínas).

El clásico ensayo para medir concentración de proteínas en alimentos es el método de Kjeldahl. Este ensayo determina el nitrógeno total en una muestra. El único componente de la mayoría de los alimentos que contiene nitrógeno son las proteínas (las grasas, los carbohidratos y la fibra dietética no contienen nitrógeno). Si la cantidad de nitrógeno es multiplicada por un factor dependiente del tipo de proteína esperada en el alimento, la cantidad total de proteínas puede ser determinada. En las etiquetas de los alimentos, la proteína es expresada como el nitrógeno multiplicado por 6.25, porque el contenido de nitrógeno promedio de las proteínas es de aproximadamente 16%. El método de Kjeldahl es usado porque es el método que la AOAC Internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) ha adoptado y por lo tanto es usado por varias agencias alimentarias alrededor del mundo. Otro método utilizado es el descrito por Bradford, (1996) donde se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende, pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes, tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la seroalbúmina bovina (Hartree, 1972; Bradford, 1996).

2.10 Enzimas

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles: una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible (ver Energía libre de Gibbs), pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima.

Las enzimas suelen ser muy específicas tanto del tipo de reacción que catalizan como del sustrato involucrado en la reacción. La forma, la carga y las características hidrofílicas/hidrofóbicas de las enzimas y los sustratos son los responsables de dicha especificidad. Las enzimas también pueden mostrar un elevado grado de estereoespecificidad, regioselectividad y quimioselectividad (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

2.11 Lacasas

Las lacasas (p-difenol: oxígeno óxido reductasas E.C: 1.10.3.2) son glicoproteínas con peso molecular entre 60-80 kDa, forman parte de las enzimas ligninolíticas que los hongos de pudrición blanca utilizan para degradar la lignina. Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, que poseen un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006). En diversos estudios se ha encontrado que las lacasas degradan colorantes provenientes de la industria textil los cuales son xenobióticos y recalcitrantes (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006) Las lacasas pueden utilizarse de forma directa, esto es, actuando como catalizadores en la eliminación o modificación de un sustrato de interés, o bien de forma indirecta, facilitando un proceso sin intervenir en el producto final. En relación a la intervención directa, un ejemplo podría ser el uso de lacasas en la clarificación de mosto de vino, jugos de frutas o cerveza, en los que los fenoles presentes en estos productos son eliminados tras su polimerización catalizada por lacasas (Martínez-Carrera *et al.*, 2010; Pardo-Castro *et al.*, 2004). En el caso de HAP, al tratarse de compuestos de naturaleza no fenólica, que no son sustratos de las

lacasas, se hace indispensable el uso de mediadores para llevar a cabo su oxidación. Entre estos mediadores, los más comúnmente usados, HBT y ABTS (**Figura 3**), se han utilizado con éxito en la oxidación de benzo-pireno y antraceno por la lacasa de *Trametes versicolor* (Novotny *et al.*, 2004; Esperanza *et al.*, 2003). Una alternativa al uso de mediadores sintéticos es el uso de mediadores naturales como fenol, anilina, ácido 4-hidroxibenzoico o alcohol 4-hidroxibenzílico, usados con igual eficiencia que el ABTS o el HBT en la degradación de diferentes HAP por la lacasa de *T. versicolor* (Martínez-Carrera *et al.*, 2010; Bourbonnais *et al.*, 1997).

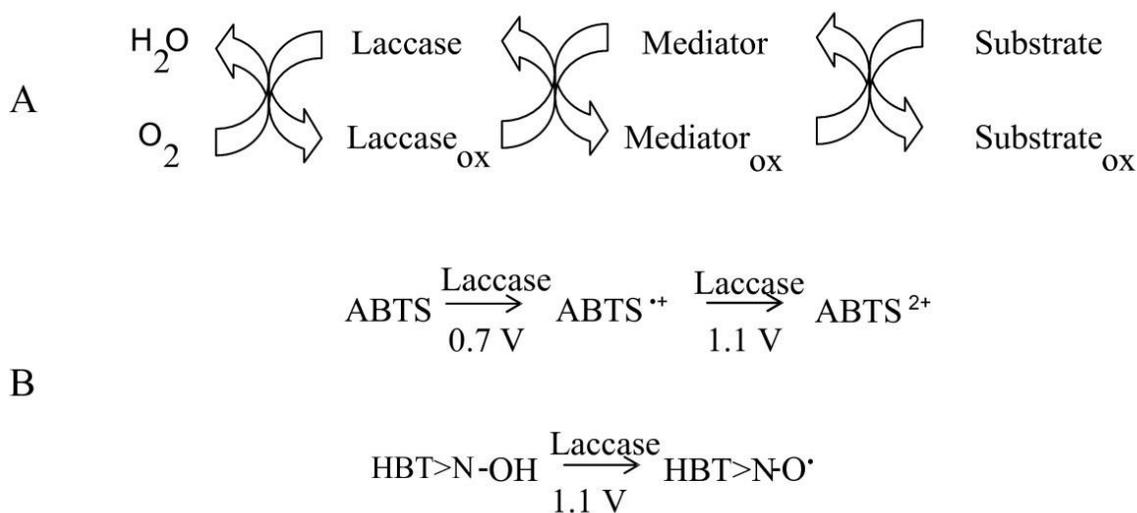


Figura 3. Papel de la enzima lacasa oxidando sustratos no habituales por la acción de los mediadores redox (A), y los potenciales redox de las reacciones de oxidación de ABTS y HBT por lacasa (B). (Kunamneni *et al* 2008).

En la presente investigación se estudió el crecimiento de una cepa del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en un medio de cultivo (agar con extracto de malta) contaminado artificialmente con antraceno en diferentes concentraciones. Se determinó el área de crecimiento, la cantidad de proteína producida, y la actividad de enzimas lacasas. Con los resultados obtenidos se pretende impulsar el aprovechamiento del sustrato residual de la producción comercial de “setas” (*Pleurotus* spp.), para procesos de biorremediación *in situ* de zonas contaminadas por hidrocarburos aromáticos policíclicos.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En nuestro país, como resultado del cultivo de hongos comestibles se producen grandes cantidades de sustrato residual, las cuales alcanzan la cantidad de 500,000 ton/año (Martínez-Carrera *et al.*, 2010) y las cuales puede ser usadas para procesos de biorremediación. Diversos estudios han demostrado que estos sustratos residuales contienen una gran cantidad de enzimas (**Tabla 2**), tales como, lacasas, manganoso peroxidasas y celulasas, entre otras (Phan y Sabaratham, 2012). Por otro lado, la mayoría de las investigaciones que se han realizado para estudiar el efecto de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, se han llevado a cabo en medios de cultivo líquido. Estos tienen la cualidad de mantener al cien por ciento el contacto de los nutrientes con el microorganismo a estudiar. Una excepción a estos estudios es el trabajo descrito por Mazzocco-Spezia, (2012), quien trabajó con medio semisólido (agar con extracto de malta). La mayor parte de las células en la naturaleza crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido, por lo que al estudiar un organismo se trata de hacer su entorno lo más similar posible a la naturaleza (Andersson, 2003). En la presente investigación, se usó también un medio de cultivo semisólido, como el agar con extracto de malta en seguimiento a los estudios previos bajo estas condiciones, se cuantificó la enzima lacasa, la cantidad de proteína, el crecimiento micelial y la producción de isoformas de las lacasas en PAGE. Con el presente trabajo, se pretende contribuir al desarrollo de bases científicas y metodológicas para el uso de los hongos comestibles en procesos de biorremediación *in situ* campos agrícolas contaminados con hidrocarburos.

4. HIPÓTESIS

El micelio del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (cepa CP-50) es capaz de producir enzimas lacasas en presencia de diferentes concentraciones de antraceno, bajo condiciones de cultivo axénico *in vitro* empleando agar con extracto de malta.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la producción de lacasas, proteínas y velocidad de crecimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en presencia de diferentes concentraciones de antraceno.

5.2 Objetivo particular

1. Cuantificar la actividad volumétrica de lacasas y la producción de proteína de *Pleurotus ostreatus* en presencia de antraceno en medio de cultivo agar con extracto de malta.
2. Determinar la producción de isoformas de lacasas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).
3. Formular una estrategia para el manejo y aplicación de cepas de hongos comestibles productores de lacasas, en procesos de biorremediación *in situ* de suelos contaminados con hidrocarburos.

6. METODOLOGÍA

El esquema de trabajo que se siguió en la presente investigación se muestra en la **Figura 4**.

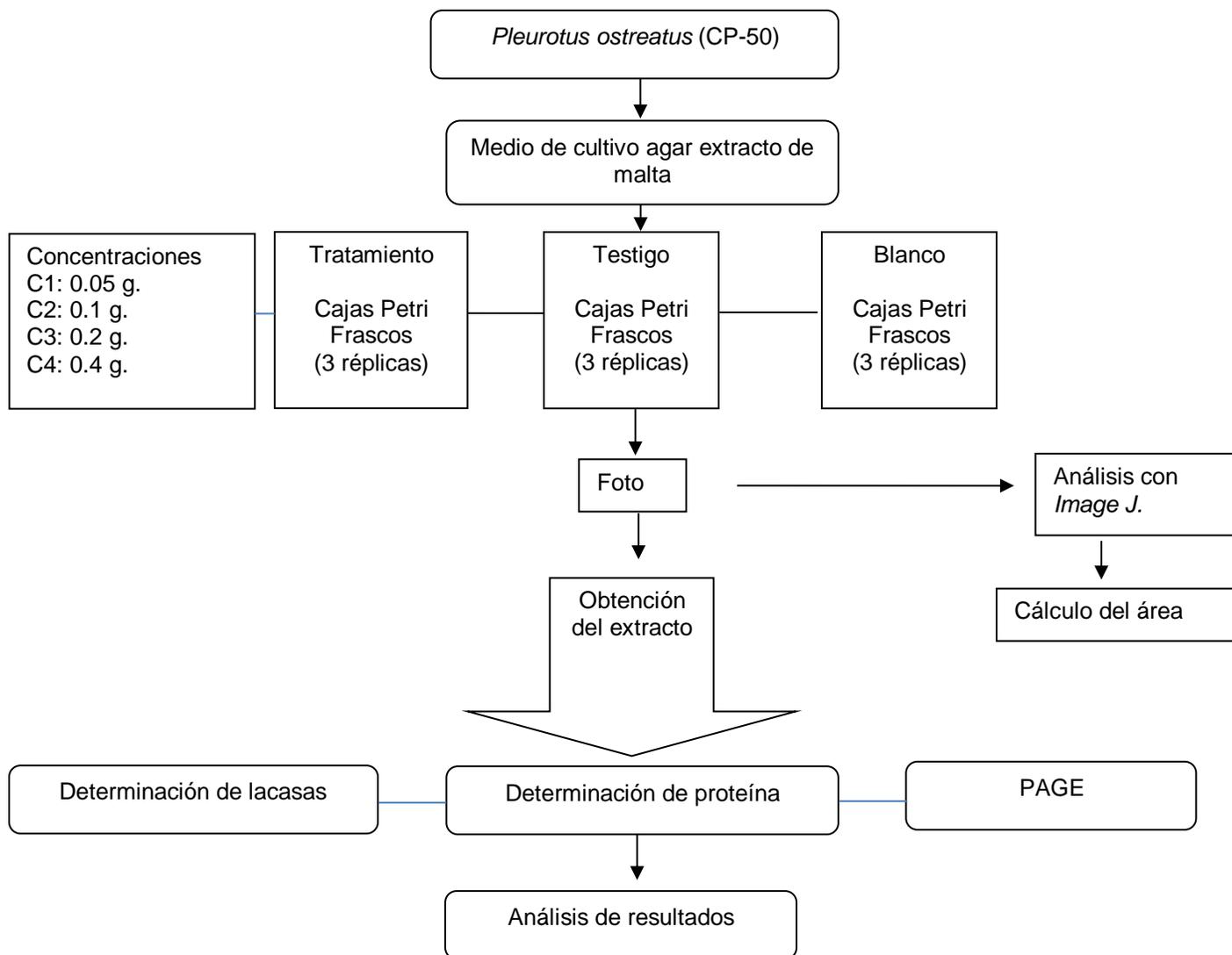


Figura 4. Metodología general de la investigación realizada en el presente trabajo.

6.1 Material biológico

El material biológico utilizado durante la investigación se encuentra depositado en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHCFyM) del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.

6.2 Medio de cultivo

La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* utilizada fue conservada y resembrada cada tres meses en medio de cultivo agar extracto de malta (EMA, Bioxon). El medio de cultivo se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El medio estéril se vertió a cajas Petri desechables de 100 x 15 mm (SYM Laboratorios, México) en una campana de flujo laminar (VECO, México). Solidificado el medio de cultivo se sembraron las cajas con la cepa de estudio y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

6.3 Condiciones experimentales

Los experimentos de crecimiento de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en medio de cultivo agar extracto de malta en presencia de antraceno se llevaron a cabo en cajas Petri de 100 x 15 mm (SYM Laboratorios, México). Con el fin de que todas las cajas Petri tuvieran la misma cantidad de medio de cultivo, este se preparó pesando 3.6 g de medio de cultivo y se agregaron en 100 mL de agua destilada estéril, después con ayuda de temperatura se homogenizó hasta su disolución en el horno de microondas, se colocaron 40 mL del medio en tubos de ensayo de 60 mL de volumen con tapa de baquelita y se esterizaron a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente, se vertió el medio en cajas Petri, en condiciones de esterilidad.

6.3.1 Esterilización del papel celofán y su colocación en la caja Petri

Para la realización del crecimiento del hongo en presencia de antraceno, se cubrió la mitad de la caja con el medio de cultivo con papel celofán. Esto con el fin de que en esta área se inoculará la cepa del hongo. Para ello, se cortó el celofán

en círculos, sirviendo la base de la caja Petri como molde y luego se cortó a la mitad. Posteriormente, se colocaron en un frasco con agua destilada y se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos. Esterilizado el celofán, se colocó sobre el agar solidificado en las cajas Petri, tal como se muestra en la **Figura 5**.

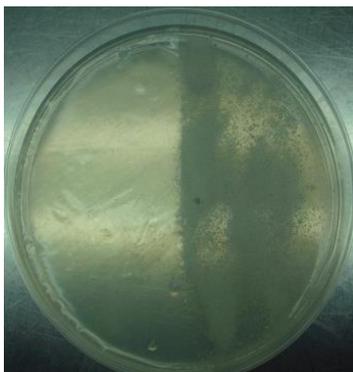


Figura 5. Forma en que se coloca el papel celofán y el antraceno en la caja Petri con medio de cultivo solidificado. El lugar donde está colocado el celofán es donde se inoculará la cepa de *P. ostreatus*.

6.3.2 Adición del antraceno a las cajas Petri

Para el estudio del efecto del antraceno sobre el crecimiento de la cepa CP-50 de *P. ostreatus*, se utilizaron cuatro concentraciones, a saber: 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 g. Cada una de las concentraciones se pesó en una balanza analítica (Ohaus, E.U.A.) y se colocó en bolsas de polipapel de 6 x 6 cm. Las bolsas con el antraceno se colocaron en un frasco de boca ancha y se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos. Esterilizado el antraceno se procedió a colocarlo en cada una de las cajas Petri con medio de cultivo solidificado, en el área que no estaba cubierta por el papel celofán estéril distribuyéndolo lo más homogéneamente posible, tal como se observa en la **Figura 5**.

6.3.3 Inoculación de las cajas Petri

La cepa CP-50 se creció en cajas Petri con medio de cultivo agar extracto de malta (EMA Bioxon, México). Con ayuda de popotes estériles se cortaron pequeños círculos de aproximadamente 5 mm de diámetro del área de crecimiento de la colonia del hongo y se colocaron en las cajas experimentales, tal como se muestra en la **Figura 6**.

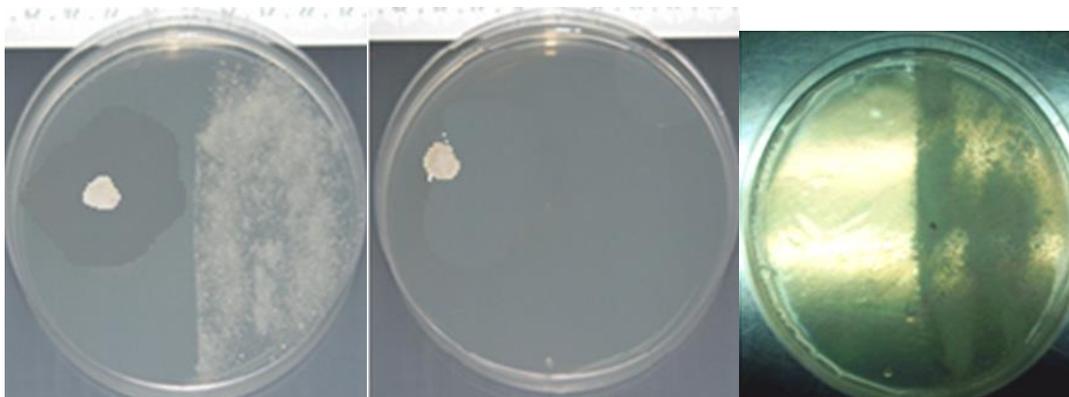


Figura 6. Lugar donde se colocó el inóculo de las cepa CP-50 de *P. ostreatus*. Caja con antraceno (izquierda), caja testigo, sin antraceno (centro) y caja con antraceno no inoculado o blanco (derecha).

6.3.4 Tratamientos y variables

Tres fueron las condiciones experimentales, a saber: 1) Tratamiento; 2) Testigo y 3) Blanco. El tratamiento contenía el inóculo de la CP-50 y la concentración de antraceno a experimentar. El testigo sólo contenía el inóculo de la CP-50, sin antraceno. El blanco consistió en sólo colocar antraceno en la caja Petri sin inocularlo con el hongo.

6.3.5 Imagen de las cajas Petri con los tratamientos

En cada uno de los tiempos de toma de muestra de los diferentes tratamientos experimentales, se capturó una imagen antes de tomar la muestra para su análisis. Esto se llevó a cabo con una cámara Cyber-Shot (DSC-H7, SONY). Esta se colocó en un tripie fijo en la misma posición durante todo el experimento. Las cajas Petri se colocaron sobre un mantel negro y con una regla junto a las cajas para tomarla como referencia en el programa. Una vez tomada la imagen se anotó en la bitácora de imágenes que tiene el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, con el fin de llevar un control para su posterior análisis. Las fotografías se guardaron en archivos por tratamiento y por día de toma de muestra para su posterior análisis.

6.4 Determinación del área con el programa *Image J*

Para llevar a cabo la determinación del área de la colonia se utilizó el programa *Image J*, 1.47v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) el cual se puede descargar gratuitamente desde la siguiente página: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Este programa puede reconocer distintos formatos de imagen, tales como: TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS y "raw". El procedimiento de cómo se llevó a cabo la determinación del área se encuentra en los anexos.

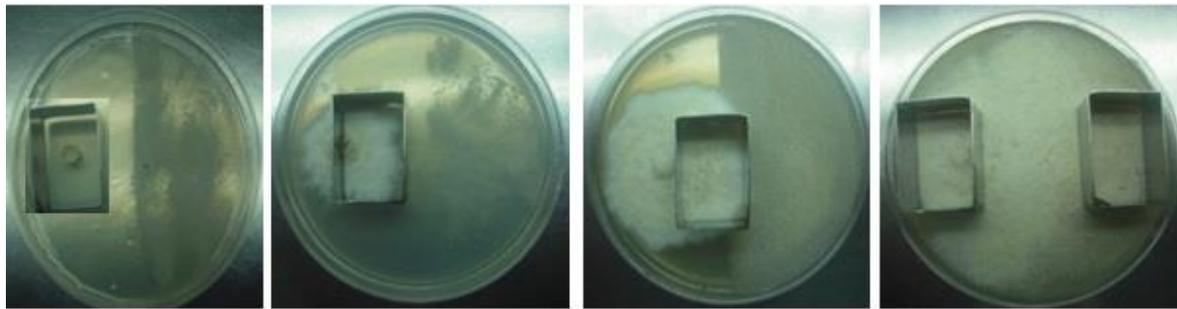
6.4.1 Procesamiento de los datos obtenidos en el programa *Image J*.

Los resultados obtenidos del área en el programa *Image J* se copiaron y se pegaron en una hoja de cálculo Excel versión 2010. A los datos se les determinó el promedio y la desviación estándar.

6.5 Obtención del sobrenadante de las muestras

En la **Figura 7**, se muestra el lugar y el momento del crecimiento de la colonia del hongo donde se realizó la toma de las muestras. Antes de tomar la muestra a cada una de las cajas en el día que le correspondía, se le tomaban fotos a las colonias, las cuales se utilizaban para la determinación del área al día de cosecha. En cada tiempo de la toma de la muestra se usaron seis cajas. Cuatro fueron los tiempos en los que se tomaron las muestras. 1) **Tiempo cero (T₀)**: se tomaron las muestras en el momento en que se inoculaban. 2) **Tiempo antes del contacto (AC)**: esta toma de la muestra se realizó cuando a la colonia del hongo le faltaba alrededor de 1 cm para alcanzar el borde del antraceno. Esto ocurría aproximadamente a los ocho días de crecimiento (**Figura 7**), 3). **Tiempo después del contacto (DC)**: la toma de la muestra se realizó cuando la colonia del hongo había crecido como 1 cm sobre el borde del antraceno y 4) **Tiempo final (CC)**: esta toma de la muestra se realizó cuando la colonia del hongo había cubierto totalmente la caja de Petri. La última toma de muestra se realizó en dos lugares de la caja: en la zona que contenía el antraceno y en la zona que no lo contenía; indicando estos dos puntos de muestreo con los signos - y +, el signo negativo

denota el sitio izquierdo donde no se colocó antraceno. El signo positivo denota el sitio derecho donde se puso el antraceno (**Figura 7**). Las tomas de las muestras se realizaron en las tres condiciones experimentales (Tratamiento; Testigo y Blanco). Para la toma de la muestra se utilizó un rectángulo de acero inoxidable estéril de 6 cm² (2 x 3 cm). La muestra se colocó en un vaso de acero inoxidable de 250 mL estéril y se le agregó 3 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M con un pH de 5. Posteriormente, se homogenizó en un homogeneizador (Pro 250, Pro Scientific) con un generador de 20 mm x 150 mm estéril a 15000 rpm por dos minutos. El homogenizado se colocó en un tubo de 50 mL (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) estéril y se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C (Sigma, 4K14, Alemania) durante 5 min. El sobrenadante se tomó con una pipeta con puntas estériles y se colocó en viales estériles de 10 mL. Todo el proceso se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar. Finalmente, las muestras se colocaron a -20°C hasta su uso. En la **Figura 7** se esquematiza la forma general del lugar donde se obtuvo la muestra con los rectángulos de acero inoxidable.

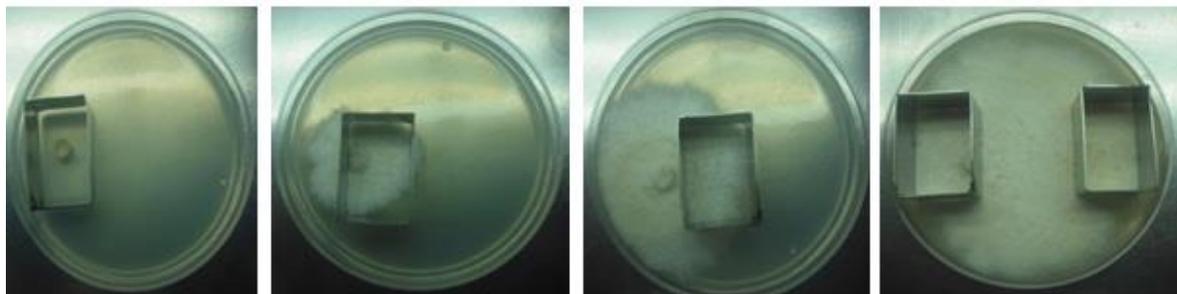


Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
(-) (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)

Figura 7. Lugares de las cajas Petri donde se realizaron la toma de las muestras en las tres condiciones experimentales. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en base a los tiempos esperados en las referencias.

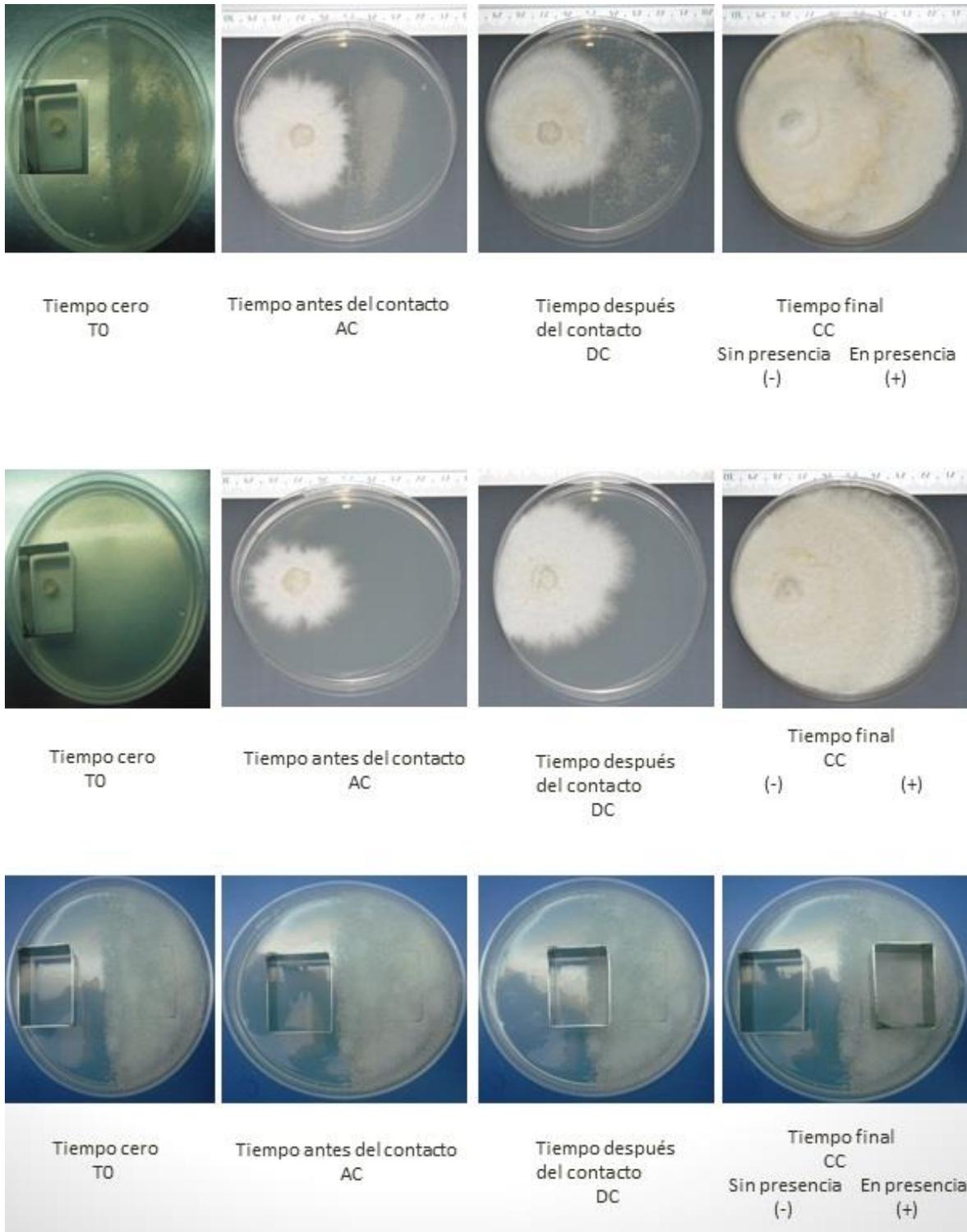


Figura 8. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.05 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.

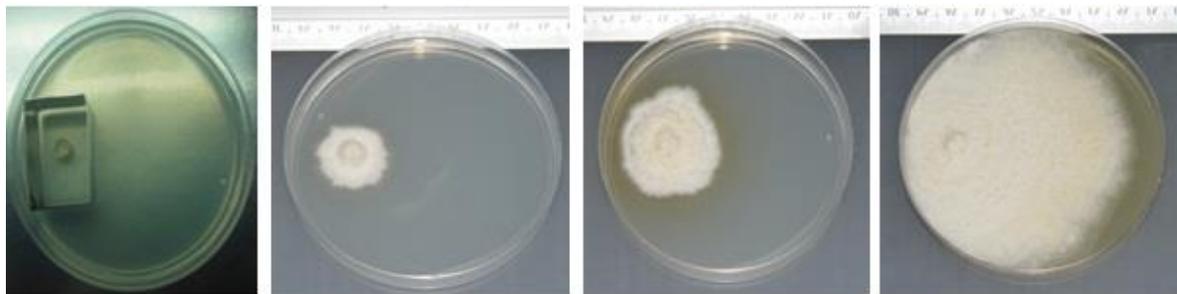


Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
(-) (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)

Figura 9. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.1 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.

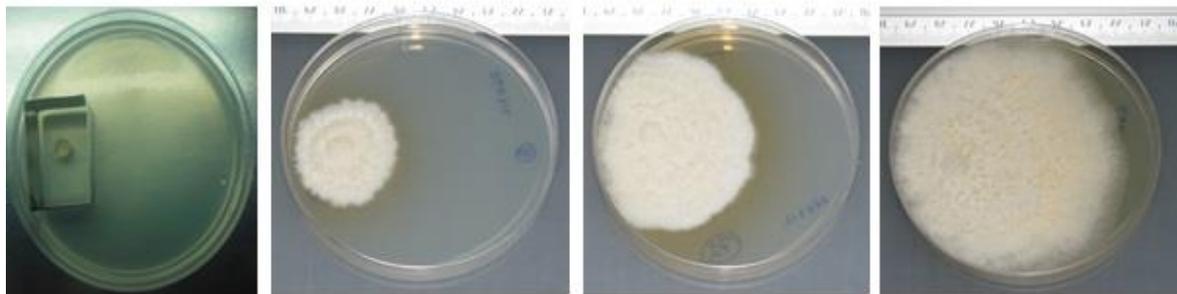


Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)

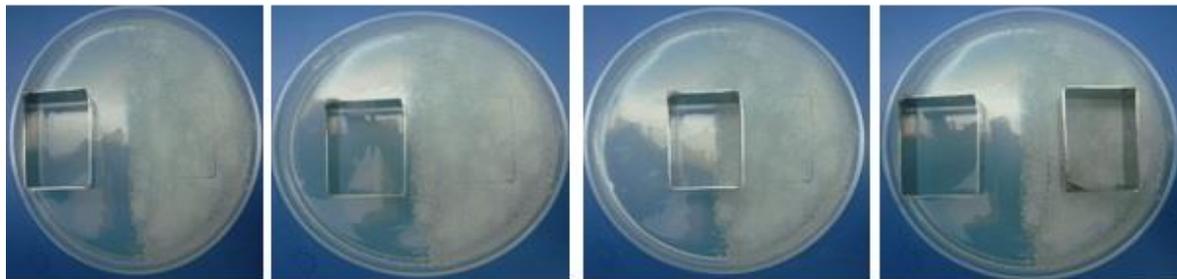


Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
(-) (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)

Figura 10. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.2 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.

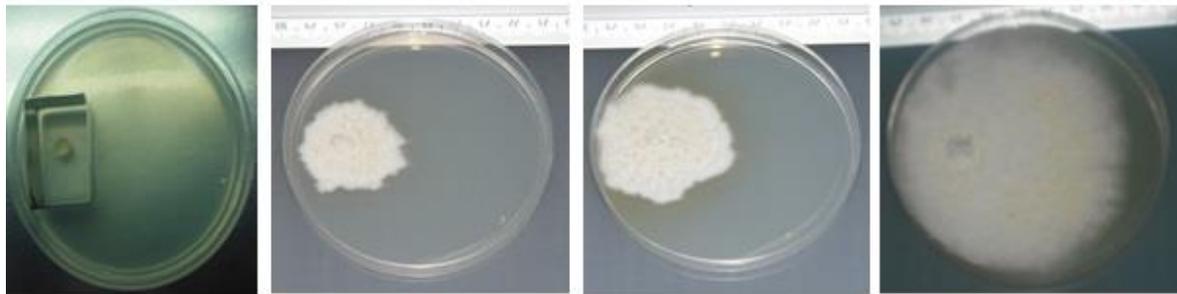


Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
(-) (+)



Tiempo cero
T0

Tiempo antes del contacto
AC

Tiempo después
del contacto
DC

Tiempo final
CC
Sin presencia (-) En presencia (+)

Figura 11. Imagen de las colonias antes de tomar la muestra para la determinación de pruebas, para el tratamiento con 0.4 g de antraceno. Arriba: Tratamiento; centro: Testigo y abajo: Blanco. Resaltando que el tiempo en tomar las muestras en cada experimento, variaron en cada tratamiento en base a los tiempos esperados en las referencias.

6.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford

El contenido de proteínas de las muestras se determinó espectrofotométricamente por medio del microensayo de Bradford (Bradford, 1976). El método se basa en la unión no covalente del Azul Coomassie a las proteínas, lo que produce una coloración azul la cual se puede medir a una longitud de onda de 595 nm. El microensayo tiene una sensibilidad dentro de un rango lineal de $8.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $80 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Un primer paso del proceso es la construcción de la curva de calibración, la cual se realizó con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma), a partir de una solución Stock de $500 \mu\text{g ml}^{-1}$, tal como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cantidades de BSA (Albúmina sérica bovina Sigma) que se agregan al agua destilada estéril para la construcción de la curva de calibración a partir de una solución Stock de $500 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Tubo	Solución estándar		Solución Stock		Agua	
	($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(mg/ml^{-1})	(mL)	(μl)	(mL)	(μl)
A	0	0	0	0	0.500	500
B	10	0.010	0.01	10	0.490	490
C	20	0.020	0.02	20	0.480	480
D	40	0.040	0.04	40	0.460	460
E	60	0.060	0.06	60	0.440	440
F	80	0.080	0.08	80	0.420	420
G	100	0.10	0.10	100	0.400	400

Se prepararon 7 tubos para la curva de calibración con distintas cantidades de proteínas ($0, 10, 20, 40, 60, 80$ y $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y otro tubo denominado blanco (en el cual el volumen de la solución de proteínas se reemplaza por agua). La reacción se llevó a cabo en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con base en forma de U estéril (Kima, Vacutest). Para la determinación de proteína, se agregaron $80 \mu\text{L}$ de los extractos o de BSA de la **Tabla 3** más $20 \mu\text{L}$ del reactivo comercial Bradford (Bio Rad Protein Assay). La mezcla se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se midió su absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Epoch, Biotek). Con las absorbancias obtenidas y

las concentraciones de la albúmina sérica bovina se graficó la curva de calibración y se obtuvieron los parámetros de la ecuación de la recta para la determinación de la proteína, por medio de la siguiente formula:

$$y = mx + b$$

Dónde:

y = Absorbancia

x = Concentración de proteína ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

b = Ordenada al origen

m = Pendiente de la recta.

6.7 Determinación de la actividad volumétrica de las lacasas

La actividad de las lacasas se determinó usando ABTS 1 mM, [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] (SIGMA) como sustrato, como buffer se utilizó acetato de sodio a 0.1 M, pH5 a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con base en forma de U estéril (Kima, Vacutest). La mezcla de la reacción que se agregó con ayuda de una pipeta multicanal con 8 puntas (Gilson, Francia), contenía en cada pozo lo siguiente: 160 μL de acetato de sodio 0.1 M, pH5, 20 μL de la muestra o el blanco y 20 μL de ABTS 1 mM, como se muestra en la **Figura 12**. La absorbancia fue medida en un lector de microplacas (Epoch, Biotek) a 420 nm durante siete minutos con intervalos de un minuto ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Matsumura *et al.* 1986). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto (Bourbonais *et al.*, 1997). En la **Figura 13** podemos observar el diagrama del procedimiento para determinar la actividad volumétrica de lacasas.

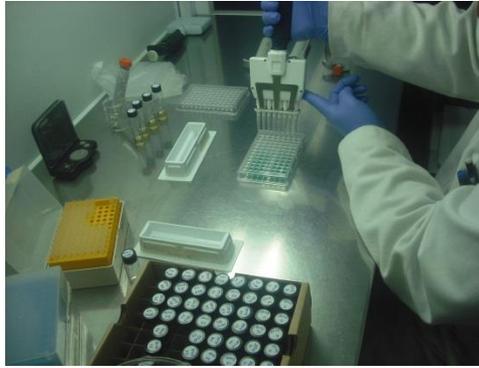


Figura 12. Forma como se agregan los reactivos para la determinación de las lacasas con ayuda de una pipeta multicanal con ocho puntas.

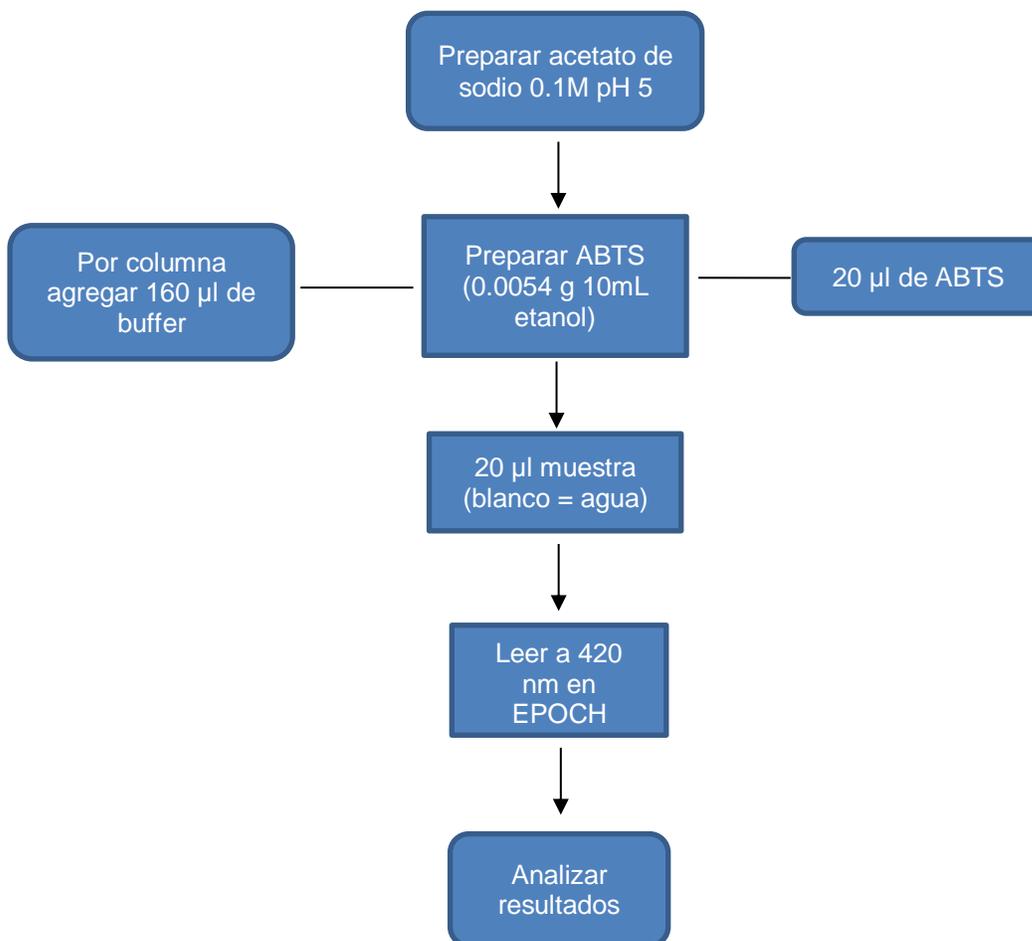


Figura 13. Esquematización del procedimiento para la determinación de la actividad volumétrica de lacasas.

6.8 Determinación de la actividad de lacasas en gel de Electroforesis Nativa (PAGE)

6.8.1 Concentración de muestras para prueba de Electroforesis Nativa (PAGE)

Una vez obtenidas las muestras de la sección 6.5 (Obtención del sobrenadante de las muestras), se tomó 1 mL por replica de cada tubo eppendorf de cada tratamiento 6 en total, y se colocaron en un filtro concentrador (Amicon Ultra-4, 30 kDa Ultracel, Millipore). El filtro se centrifugó a 7500xg (Sigma, 4K14, Alemania) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final se obtuvo un volumen aproximado de 50 μ L. Estas muestras se utilizaron para realizar el análisis en el gel de poliacrilamida (PAGE).

6.8.2 Preparación del gel para Electroforesis Nativa (ND-PAGE)

Para la electroforesis nativa se utilizaron geles de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemmli (1970), sin Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). El gel separador o analítico se preparó al 8% y el gel concentrador al 5% (**Tabla 4**). Primero se preparó el gel separador, de acuerdo a los componentes que se mencionan en la **Tabla 4**, y se agregó al casete de cristal, cuidando de no formar burbujas. Se le agregó un 1 mL de agua para alinear el gel y al mismo tiempo observar la polimerización, posteriormente se eliminó el agua y se agregó el gel concentrador. Después de polimerizado el gel, el volumen de muestra por pozo fue de 20 μ L. 5 μ L de la muestra concentrada que contenía 5 μ g de proteína más 15 μ L de buffer de carga no desnaturizante [2.5 mL de Buffer de TRIS 0.5 M pH 6.8, 2 mL de Glicerol (Sigma-Aldrich), 4 mL de agua destilada estéril, 3 mg de Azul de Bromofenol (Sigma-Aldrich)] se mezclaron y se agregaron al pozo del gel. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad). Se aplicó inicialmente un voltaje de 50 V durante una hora y luego se aumentó a 130 V hasta que el colorante alcanzara a recorrer hasta el final de la placa. Posteriormente, el gel se enjuagó en un recipiente de cristal que contenía 15 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 5 por 5 segundos. Después de enjuagar el gel se colocaba en un recipiente limpio con 15 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 5 y 15 mL de ABTS 10 mM, durante 30 minutos en una incubadora

orbital (MaxQ 4000, Thermo Scientific) a temperatura ambiente, a 60 rpm. Posteriormente, se enjuagaba dos veces en buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 5 durante 3 minutos. Finalmente, dejaba reposar durante 30 minutos o hasta que aparecieran las bandas. Una vez que aparecían las bandas se procedía a capturar la imagen con una cámara Cyber-Shot (DSC-H7, SONY).

Tabla 4. Cantidades de reactivos que se agregan para elaborar el gel de poliacrilamida nativo de acuerdo al porcentaje requerido.

Componente	Tipo de gel de acrilamida						
		Separador (μl)			Concentrador (μl)		
	%	10	9	8	5	4	3
Acrilamida 40%		1740	1566	1392	300	240	180
Buffer TRIS 1.5 M pH 8.8		1680	1512	1344			
Buffer TRIS 0.5 M pH 6.8					800	640	480
Agua destilada estéril		3438	3094.2	2750.4	1391	1112.8	834.6
Persulfato de amonio (APS 10%)		60	54	48	14.6	11.68	8.76
TEMED		6	5.4	4.8	2.9	2.32	1.74

6.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como medias (SD) y su desviación estándar. Los resultados fueron analizados por el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Duncan con una $\alpha = 0.05$. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el programa The SAS System for Windows 9.0 (SAS).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la producción de la enzima lacasa del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, CP-50 en presencia de antraceno. Se creció al hongo en cuatro concentraciones diferentes de antraceno, las cuales fueron: 0.05 g, 0.1 g, 0.2 g, y 0.4 g por caja Petri. Cuatro tomas de muestras se realizaron durante el periodo del crecimiento de la colonia del hongo. La primera fue al tiempo cero (T0) y esta se llevó a cabo en el primer día en que se inocularon las cajas. La segunda toma de la muestra se llevó a cabo antes del contacto, de la colonia con el antraceno, en un equivalente ocho días aproximadamente (AC). La tercera toma de muestra fue después de que hubo contacto con el antraceno (DC), a los 16 días aproximadamente. La última toma de muestra se llevó a cabo cuando la cepa colonizo totalmente la caja (CC) esto fue en un lapso aproximado de 24 días.

Cuando el micelio del hongo *P. ostreatus* estuvo en presencia en las diferentes concentraciones de antraceno, no se observó un efecto significativo en la morfología de la colonia (**Figura 14-17**).

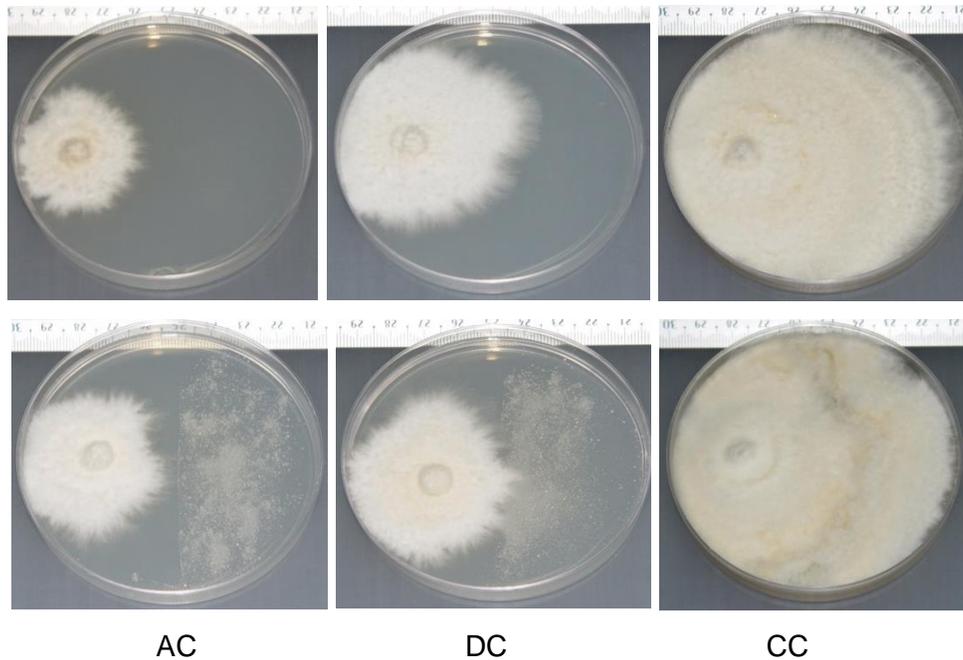


Figura 14. Crecimiento de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.05 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

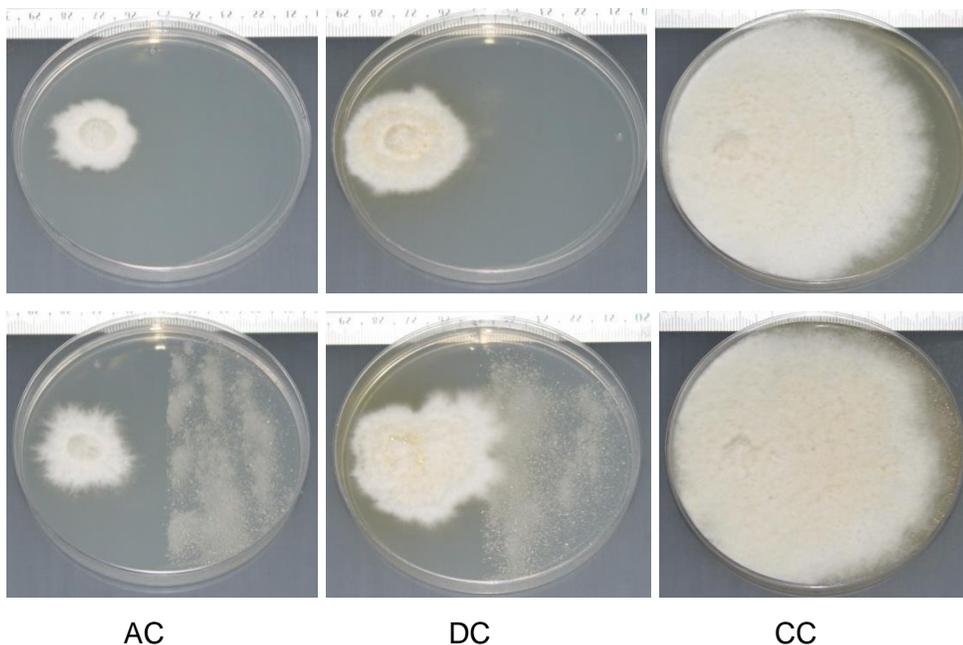
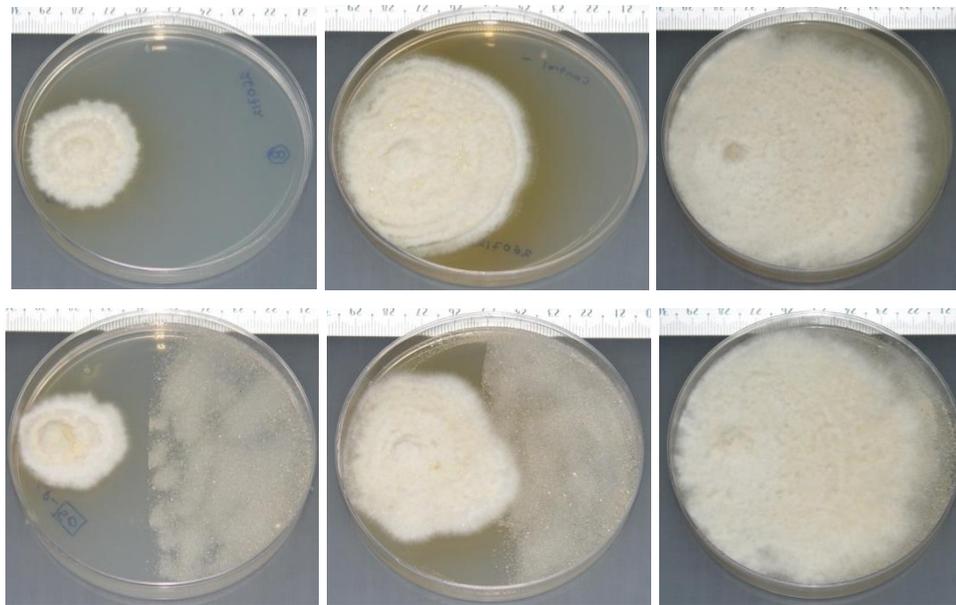


Figura 15. Crecimiento de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.1 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.



AC

DC

CC

Figura 16. Crecimiento de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.2 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.



AC

DC

CC

Figura 17. Crecimiento de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en medio de cultivo EMA, testigo (arriba) y con 0.4 g de antraceno (abajo) en las tres tomas de muestra: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

7.1 Determinación del área de crecimiento

En la **Figura 18**, podemos observar el efecto de 0.05 g de antraceno con el crecimiento micelial en la cepa CP-50 de *P. ostreatus*. Las cepas tardaron 17 días en colonizar totalmente la caja Petri, tanto en el testigo como en el tratamiento. El único efecto que se puede observar en los cuatro tratamientos, fue el tiempo en colonizar completamente la caja.

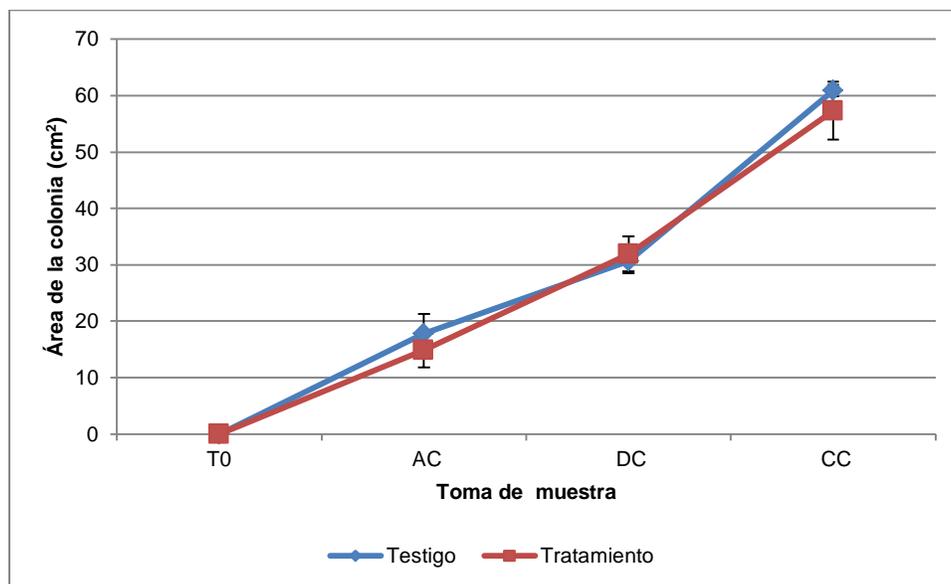


Figura 18. Crecimiento micelial en cm^2 de las colonias de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el testigo y tratamiento (0.05 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 19**, podemos observar el efecto de 0.1 g de antraceno con el crecimiento micelial en la cepa CP-50 de *P. ostreatus*. Las cepas tardaron 33 días en colonizar totalmente la caja Petri, tanto en el testigo como en el tratamiento.

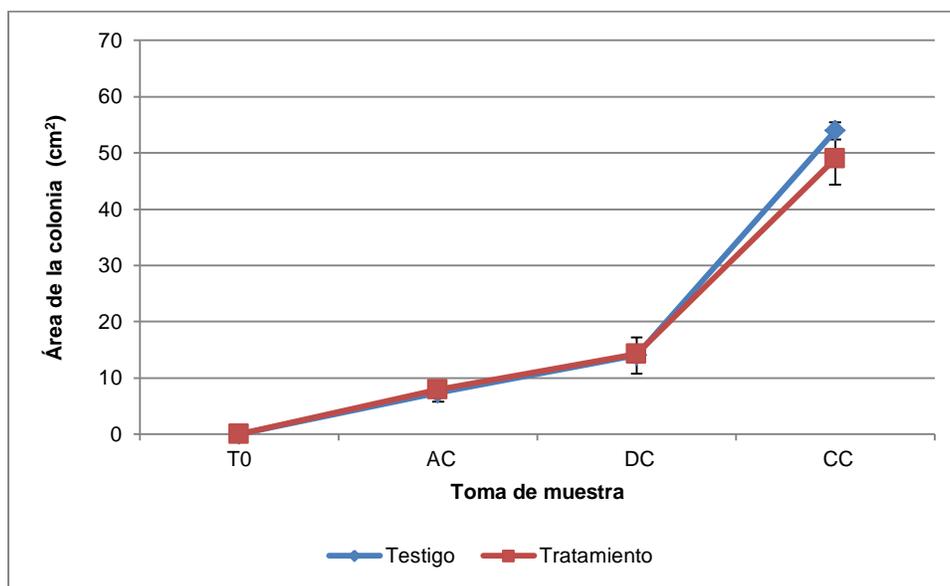


Figura 19. Crecimiento micelial en cm^2 de las colonias de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el testigo y tratamiento (0.1 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 21**, podemos observar el efecto de 0.2 g de antraceno con el crecimiento micelial en la cepa CP-50 de *P. ostreatus*. Las cepas tardaron 22 días en colonizar totalmente la caja Petri, tanto en el testigo como en el tratamiento.

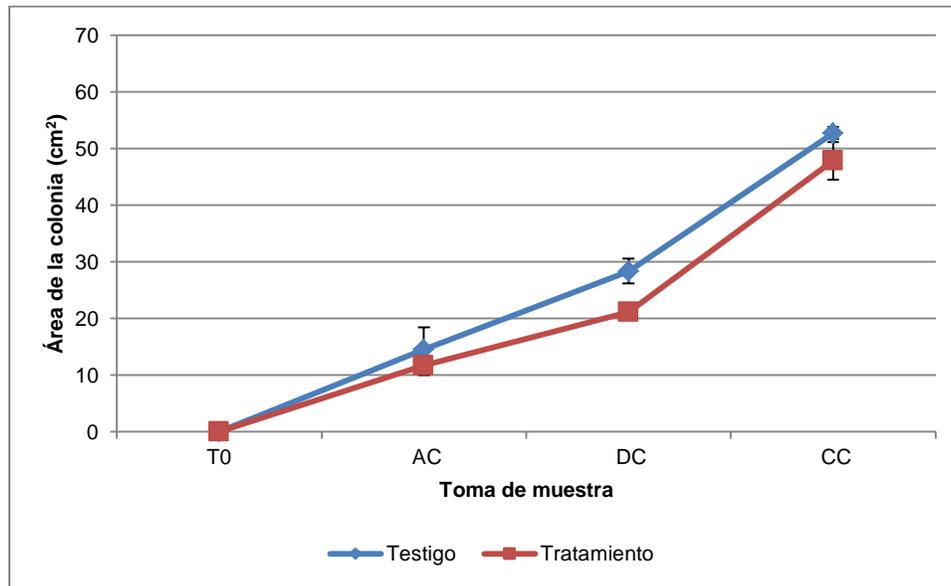


Figura 20. Crecimiento micelial en cm² de las colonias de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el testigo y tratamiento (con 0.2 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 21**, podemos observar el efecto de 0.4 g de antraceno con el crecimiento micelial en la cepa CP-50 de *P. ostreatus*. Las cepas tardaron 20 días en colonizar totalmente la caja Petri, tanto en el testigo como en el tratamiento.

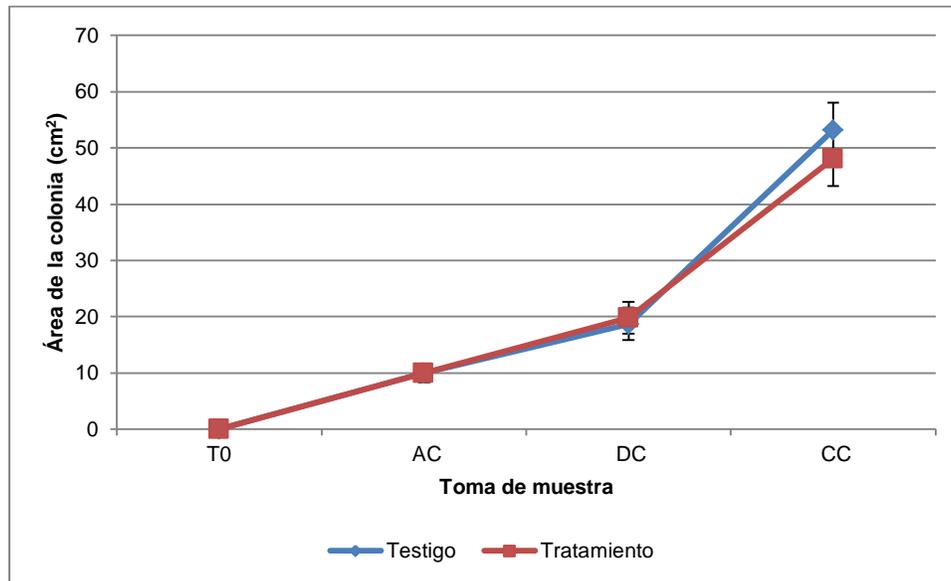


Figura 21. Crecimiento micelial en cm^2 de las colonias de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en el testigo y tratamiento (con 0.4 g de antraceno) en medio de cultivo EMA a diferentes días de crecimiento. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

7.2 Contenido de proteína

En la **Figura 22**, podemos observar la producción de proteínas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.05 g de antraceno. En el segundo y tercer punto (AC, DC) se observa que la producción de proteína es muy parecida, tanto en el tratamiento como en el testigo. Sin embargo, en el último punto (CC-, CC+), existe un mayor contenido en la zona sin presencia de antraceno (CC-), 49.91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el testigo y 53.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el tratamiento, teniendo entre estos una diferencia de 3.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La producción de proteína del punto con antraceno (CC+) fue de 35.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el testigo y 36.21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el tratamiento.

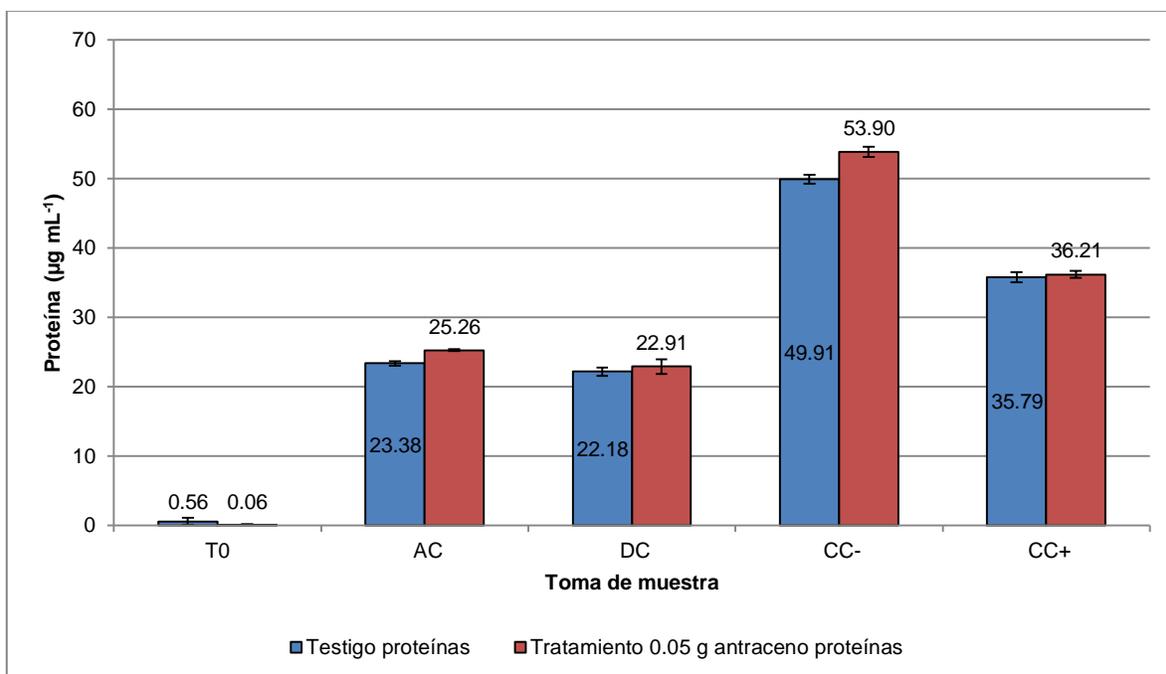


Figura 22. Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.05 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 23**, podemos observar la producción de proteínas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.1 g de antraceno. En el segundo y tercer punto (AC, DC) se observa que el comportamiento entre el testigo y el tratamiento por separado siguen un mismo comportamiento, en el testigo dando un promedio de $27.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el tratamiento un promedio entre los dos puntos de $34.82 \mu\text{g mL}^{-1}$, se observa una diferencia entre el mismo tratamiento de $4.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ entre el punto AC y DC. En el último punto (CC-, CC+), existe un mayor contenido en la zona sin presencia de antraceno (CC-) para el testigo que en el tratamiento, caso contrario en el punto con antraceno (CC+) dando un contenido de proteína de $39.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el tratamiento, seguido del testigo con $39.39 \mu\text{g mL}^{-1}$, teniendo entre estos una diferencia de $0.51 \mu\text{g mL}^{-1}$.

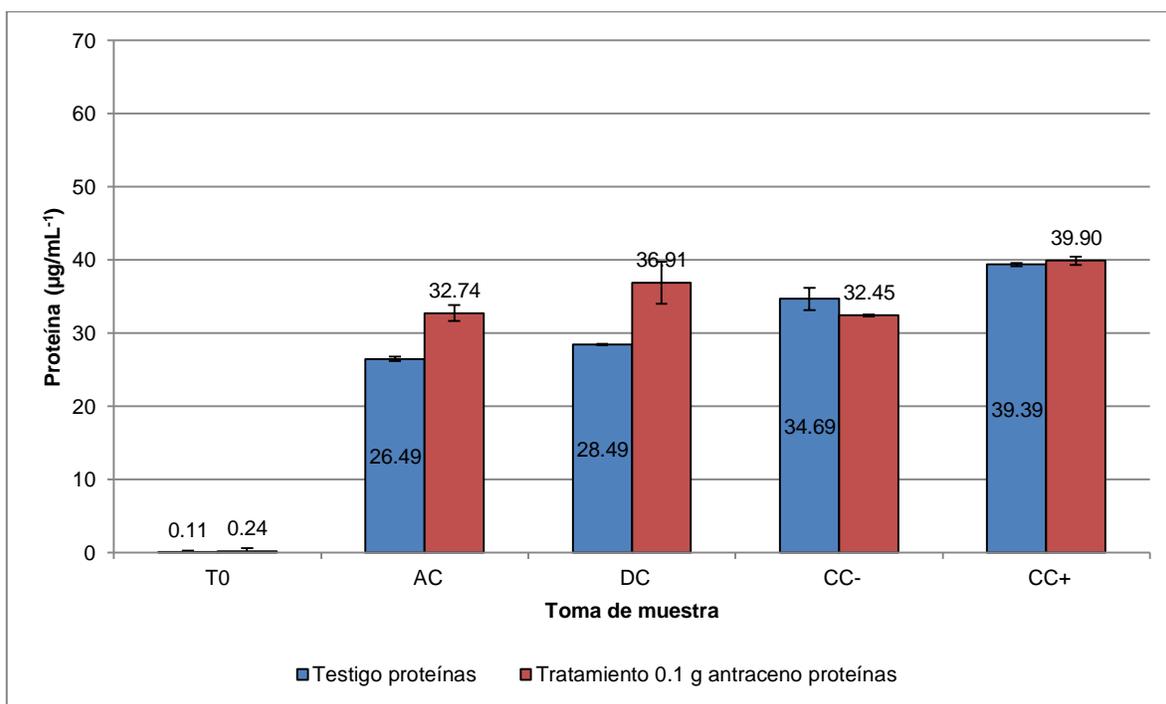


Figura 23. Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.1 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 24**, podemos observar la producción de proteínas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.2 g de antraceno. En el segundo punto (AC) se observa que entre el testigo y el tratamiento hay una diferencia de $6.62 \mu\text{g mL}^{-1}$, teniendo la preferencia el tratamiento con una producción de $27.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína. En el tercer punto (DC) se observa el mismo comportamiento dando entre estos una diferencia más grande de $9.97 \mu\text{g mL}^{-1}$, produciendo $37.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ el tratamiento. En el último punto del lado donde no contenía antraceno (CC-), se observa un comportamiento similar entre el testigo y el tratamiento, caso contrario en el lado donde contenía antraceno (CC+), donde el tratamiento tiene una diferencia a su favor de $4.49 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dando $37.48 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína.

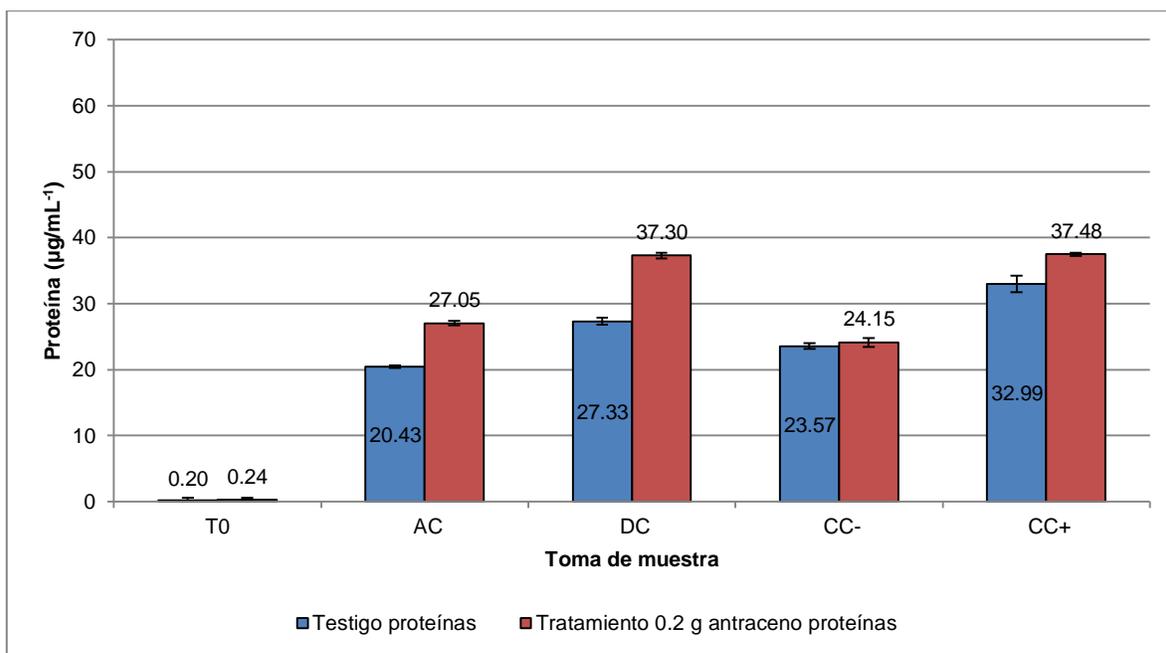


Figura 24. Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.2 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 25**, podemos observar la producción de proteínas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.4 g de antraceno. En el segundo punto (AC) se observa que entre el testigo y el tratamiento hay una diferencia de $4.12 \mu\text{g mL}^{-1}$, teniendo la preferencia el tratamiento con $37.52 \mu\text{g mL}^{-1}$. En el tercer punto (DC) se observa el mismo comportamiento dando entre estos una diferencia de $1.92 \mu\text{g mL}^{-1}$, En el último punto del lado donde no contenía antraceno (CC-), se observa un comportamiento con una gran diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento, dando una diferencia de $17 \mu\text{g mL}^{-1}$, con una producción de $42.64 \mu\text{g mL}^{-1}$. Caso similar se presentó en el punto con antraceno (CC+) dando una diferencia más grande de $30.42 \mu\text{g mL}^{-1}$. Y una producción de proteína de $49.84 \mu\text{g mL}^{-1}$.

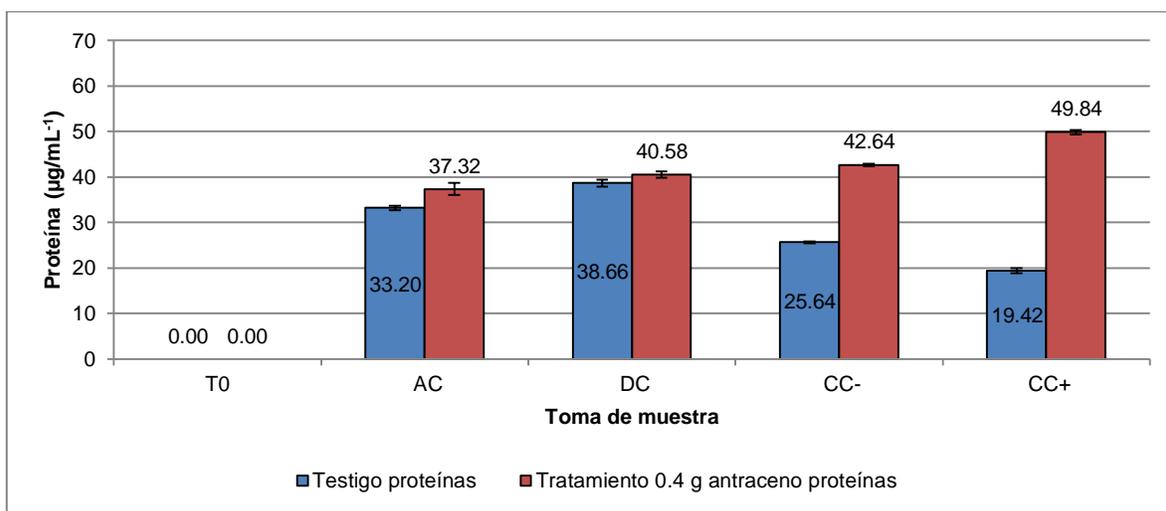


Figura 25. Producción de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.4 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

7.3 Producción de lacasas

En la **Figura 26**, podemos observar la producción de lacasas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.05 g de antraceno. En el segundo punto (AC) se observa que entre el testigo y el tratamiento hay una diferencia de 2.52 U mL^{-1} , teniendo la preferencia el tratamiento con 19.02 U mL^{-1} . En el tercer punto (DC) se observa el mismo comportamiento dando entre estos una diferencia de 5 U mL^{-1} con 16.46 U mL^{-1} . En el último punto del lado donde no contenía antraceno (CC-), se observa un comportamiento con una diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento de 5.99 U mL^{-1} . Dando el mayor contenido de lacasas el punto con antraceno (CC+), obteniendo por parte del tratamiento una diferencia más grande de 9.23 U mL^{-1} con 21.31 U mL^{-1} .

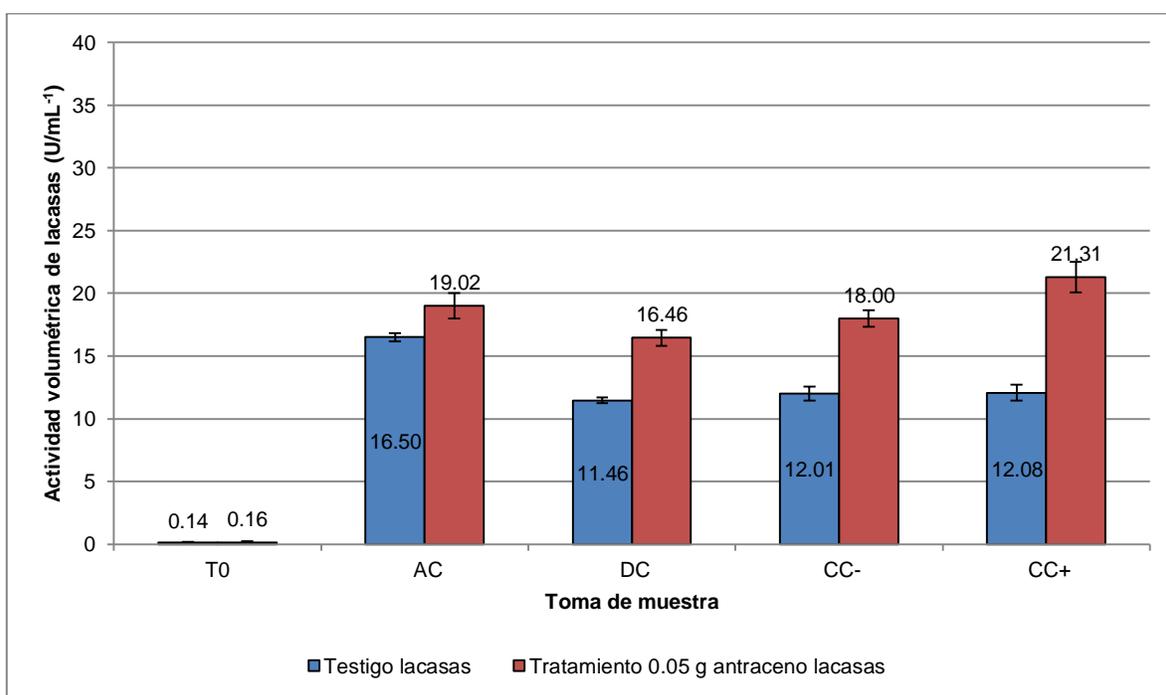


Figura 26. Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.05 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 27**, podemos observar la producción de lacasas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.1 g de antraceno. En el segundo punto (AC) se observa que entre el testigo y el tratamiento hay una baja diferencia de 0.77 U mL^{-1} , teniendo la preferencia el tratamiento. Dando el mayor contenido de lacasas el tercer punto (DC) donde se observa el mismo comportamiento con el anterior punto dando entre estos una diferencia de 2.45 U mL^{-1} con una producción de lacasas de 23.18 U mL^{-1} . En el último punto del lado donde no contenía antraceno (CC-), se observa un comportamiento con una diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento de 0.48 U mL^{-1} . El punto con antraceno (CC+), dio el tratamiento una diferencia más grande que el testigo de 2.23 U mL^{-1} con 10.97 U mL^{-1} de lacasas.

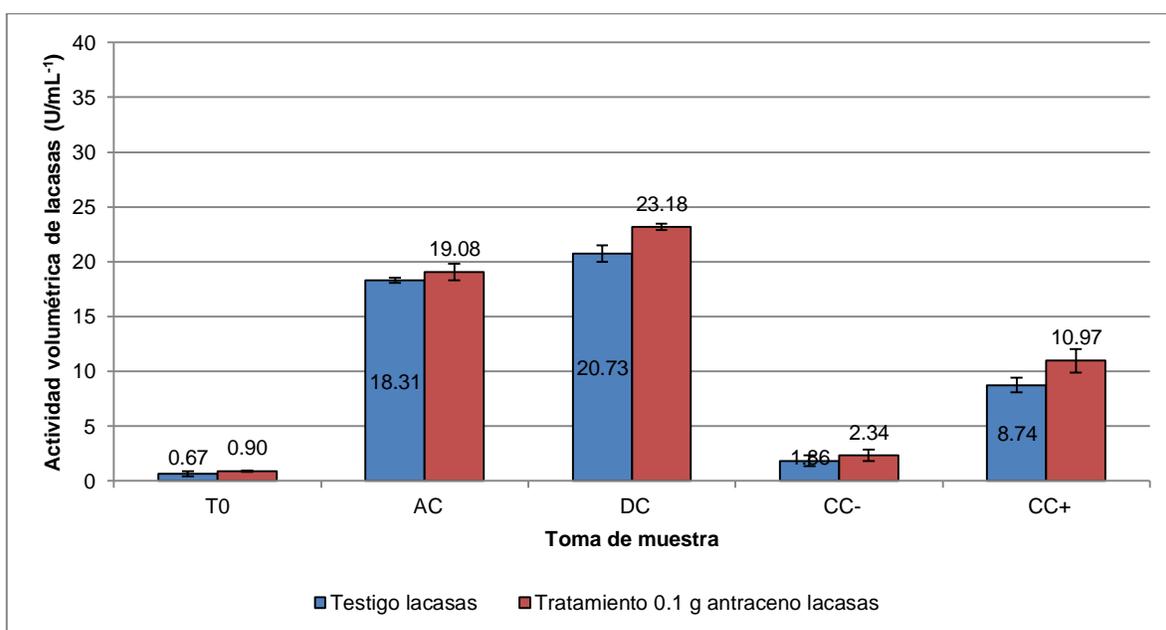


Figura 27. Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.1 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 28**, podemos observar la producción de lacasas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.2 g de antraceno. En el segundo punto (AC) se observa que entre el testigo y el tratamiento hay una alta diferencia de 7.75 U mL⁻¹, teniendo la preferencia el tratamiento con 13.05 U mL⁻¹. Dando el mayor contenido de lacasas el tercer punto (DC) donde se observa el mismo comportamiento con el anterior punto dando entre estos una diferencia de 1.88 U mL⁻¹ produciendo 23.26 U mL⁻¹ el tratamiento. En el último punto del lado donde no contenía antraceno (CC-), se observa un comportamiento con una diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento de 4.86 U mL⁻¹. En el punto con antraceno (CC+), dio el tratamiento una diferencia más grande que el testigo de 9.46 U mL⁻¹ con 22.04 U mL⁻¹ de lacasas.

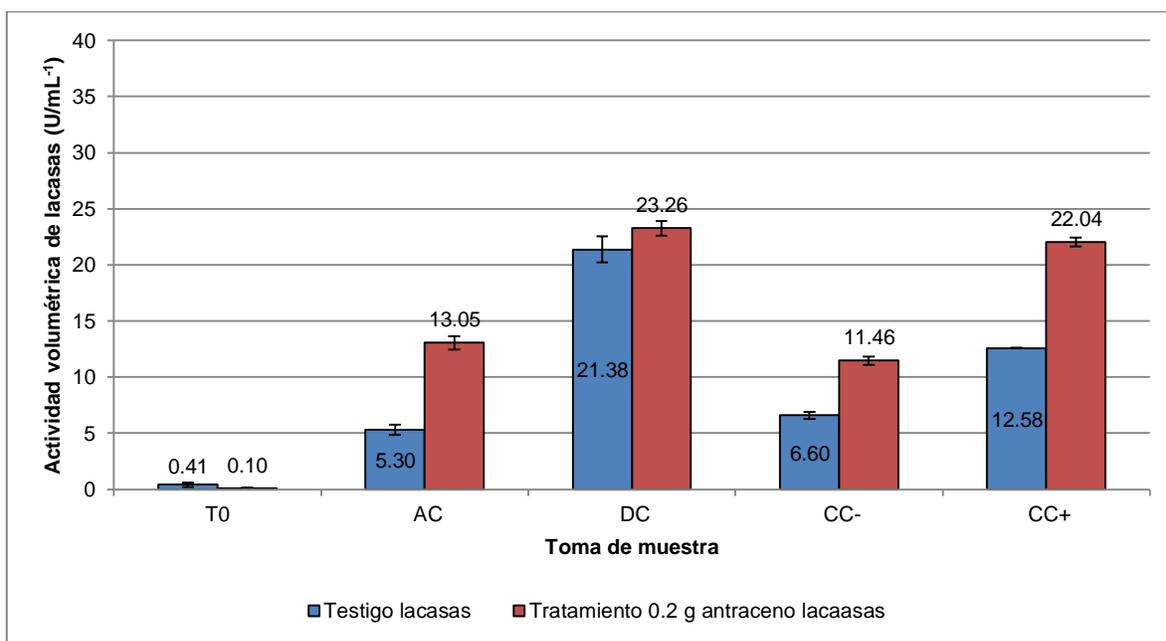


Figura 28. Actividad volumétrica de las lacasas (U mL⁻¹) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.2 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

En la **Figura 29**, podemos observar la producción de lacasas de la cepa CP-50 (*P. ostreatus*), del tratamiento con 0.4 g de antraceno. En el segundo punto (AC) se observa el mayor contenido de lacasas, donde se observó entre el testigo y el tratamiento una alta diferencia de 7.6 U mL^{-1} por parte del tratamiento 32.67 U mL^{-1} y el testigo 25.07 U mL^{-1} . El tercer punto (DC) tuvo el mismo comportamiento que en el anterior punto, dando entre estos una diferencia de 5.07 U mL^{-1} , En el último punto del lado donde no contenía antraceno (CC-), se observa un comportamiento con una diferencia entre el testigo y el tratamiento de 1.95 U mL^{-1} . El punto con antraceno (CC+), dio el tratamiento una diferencia más grande que el testigo de 6.15 U mL^{-1} produciendo 15.64 U mL^{-1} de lacasas.

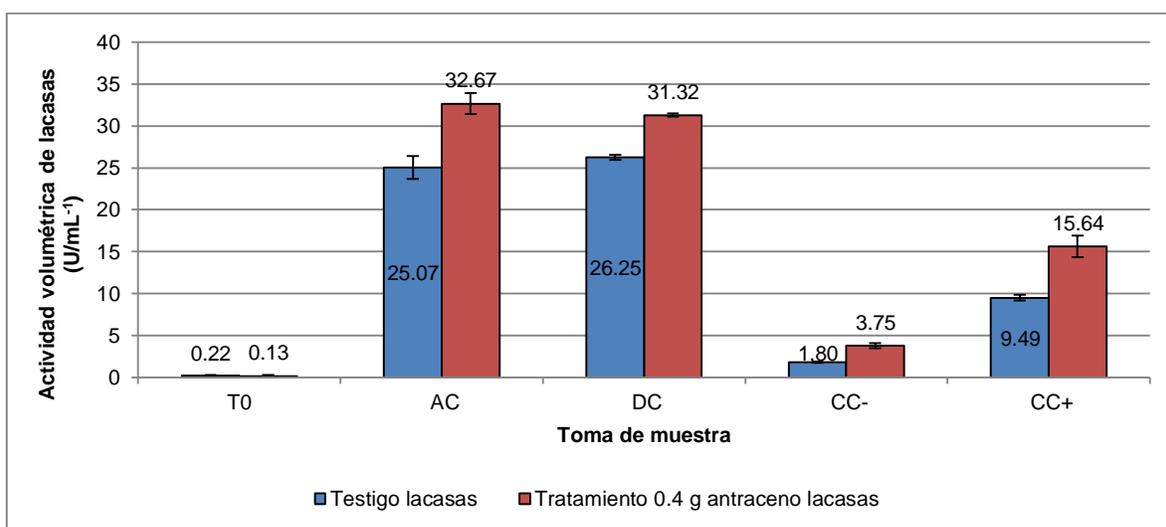


Figura 29. Actividad volumétrica de las lacasas (U mL^{-1}) de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio de cultivo EMA en el testigo y en el tratamiento (antraceno, 0.4 g por caja Petri) a diferentes días de incubación. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

La gran capacidad que mostro la cepa CP-50 de *P. ostreatus* para tolerar y crecer en altas concentraciones de antraceno, le confiere una ventaja para utilizarse en medios altamente contaminados.

Al analizar las variables estudiadas estadísticamente, se comprueba que el hongo fue capaz de producir enzima lacasa en presencia de antraceno. Agrupando los valores en diferentes grupos, ubicando el de mayor producción de enzimas con la mayor concentración de antraceno (Grupo a). Esto demostró que la cepa CP-50 de *P. ostreatus* es una cepa con posibilidad de biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos (**Tabla 5**). Por otro lado, las demás variables también se agruparon de acuerdo a los tratamientos a los que sometió la cepa, siendo la concentración de antraceno de 0.05 g el que más proteína produjo.

Tabla 5 Producción de proteína, lacasas y área de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* en las diferentes concentraciones de antraceno, cultivado en cajas de Petri con medio extracto de malta agar (EMA).

Antraceno (g)	Toma de muestra	Tratamientos	Área de la colonia (cm ²)	Proteínas (µg mL ⁻¹)	Lacasas (U mL ⁻¹)	
0.05 g	T0	Testigo	0 ± 0	0.56 ± 0.29 r	0.14 ± 0.03 s	
		Tratamiento	0 ± 0	0.06 ± 0.06 r	0.16 ± 0.05 s	
	AC	Testigo	17.78 ± 2.06 j, i, k	23.38 ± 0.2 p, o	16.32 ± 0.18 i	
		Tratamiento	14.86 ± 1.76 j, l, k	25.26 ± 0.09 n, m	19.02 ± 0.59 h	
	DC	Testigo	30.69 ± 1.24 h	22.18 ± 0.36 p	11.46 ± 0.14 k l	
		Tratamiento	31.95 ± 1.78 h	22.91 ± 0.63 p, o	16.46 ± 0.37 i	
	CC-	Testigo	60.95 ± 0.59 b,a	49.91 ± 0.36 b	12.01 ± 0.33 k, j, l	
		Tratamiento	57.32 ± 2.97 b,a	53.9 ± 0.43 a	18 ± 0.38 h	
	CC+	Testigo	62.7 ± 1.2 a	35.79 ± 0.42 i, h	12.08 ± 0.38 k, j, l	
		Tratamiento	58.34 ± 0.26 b,a	36.21 ± 0.29 g, h	21.31 ± 0.7 g f	
	0.1 g	T0	Testigo	0 ± 0	0.11 ± 0.11 r	0.67 ± 0.14 s
			Tratamiento	0 ± 0	0.24 ± 0.24 r	0.9 ± 0.04 r s
AC		Testigo	7.32 ± 0.92 n	26.49 ± 0.16 l, m	18.31 ± 0.13 h	
		Tratamiento	7.96 ± 0.82 n	32.74 ± 0.63 j	19.08 ± 0.43 h	
DC		Testigo	14 ± 1.84 m, l, k	28.49 ± 0.04 k	20.73 ± 0.44 g	
		Tratamiento	14.26 ± 0.85 j, m, l, k	36.91 ± 1.65 g h	23.18 ± 0.17 e	
CC-		Testigo	53.94 ± 0.89 d c	34.69 ± 0.89 i	1.86 ± 0.28 r q	
		Tratamiento	48.97 ± 2.65 f g e	32.45 ± 0.08 j	2.34 ± 0.3 q	
CC+		Testigo	52.3 ± 0.52 d f g e	39.39 ± 0.13 e d	8.74 ± 0.39 m	
		Tratamiento	51.18 ± 0.7 d f g e	39.9 ± 0.32 e d	10.97 ± 0.62 l	
0.2 g		T0	Testigo	0 ± 0	0.2 ± 0.2 r	0.41 ± 0.12 s
			Tratamiento	0 ± 0	0.24 ± 0.21 r	0.1 ± 0.02 s
	AC	Testigo	14.57 ± 2.23 j m l k	20.43 ± 0.1 q	5.3 ± 0.25 o	

	DC	Tratamiento	11.68 ± 0.92 n m l	27.05 ± 0.21 l	13.05 ± 0.34 j	
		Testigo	28.4 ± 1.27 h	27.33 ± 0.29 l k	21.38 ± 0.68 g f	
	CC-	Tratamiento	21.13 ± 0.42 i	37.3 ± 0.27 g	23.26 ± 0.37 e	
		Testigo	52.76 ± 0.61 d f c e	23.57 ± 0.23 o	6.6 ± 0.18 n	
	CC+	Tratamiento	47.86 ± 1.91 g	24.15 ± 0.4 n o	11.46 ± 0.21 k l	
		Testigo	52.86 ± 0.69 d c e	32.99 ± 0.7 j	12.58 ± 0.02 k j	
	0.4 g	T0	Tratamiento	47.57 ± 2.15 g	37.48 ± 0.14 g f	22.04 ± 0.21 f
			Testigo	0 ± 0	0 ± 0 r	0.22 ± 0.04 s
AC		Tratamiento	0 ± 0	0 ± 0 r	0.13 ± 0.07 s	
		Testigo	9.91 ± 0.88 n m	33.2 ± 0.31 j	25.07 ± 0.79 d	
DC		Tratamiento	9.95 ± 1.16 n m	37.32 ± 0.77 g	32.67 ± 0.71 a	
		Testigo	18.71 ± 1.65 j i	38.66 ± 0.45 e f	26.25 ± 0.17 c	
CC-		Tratamiento	19.79 ± 1.43 i	40.58 ± 0.4 d	31.32 ± 0.11 b	
		Testigo	53.13 ± 2.82 d c e	25.64 ± 0.15 m	1.8 ± 0.03 r q	
CC+		Tratamiento	48.08 ± 0.41 f g	42.64 ± 0.14 c	3.75 ± 0.17 p	
		Testigo	58.86 ± 0.51 b a	19.42 ± 0.35 q	9.49 ± 0.2 m	
		Tratamiento	48.08 ± 0.41 f g	49.84 ± 0.31 b	15.64 ± 0.74 i	
		Testigo				

Los valores se expresan como media +/- SD de mediciones por triplicado. Las medias con letras diferentes son significativamente disímiles ($P < 0,05$, ANOVA, Duncan), $n=3$. AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

7.4 Gel de Electroforesis Nativa (PAGE)

P. ostreatus posee genes de múltiples lacasas que codifican diversas isoformas dependiendo de la cepa de estudio y de las condiciones del medio de cultivo donde crecen y las cuales poseen diferentes propiedades (Díaz *et al.*, 2013). El efecto que tiene el antraceno en el patrón de la producción de las lacasas en el gel de electroforesis nativa se puede observar en la **Figura 30**. De acuerdo al PAGE, se puede observar la presencia de una banda en las cuatro concentraciones de antraceno (0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 g/caja), al momento de antes del contacto del micelio con el antraceno y después del contacto con el antraceno. La nomenclatura que se utilizó para identificar cada muestra fue la siguiente: AC= antes del contacto del micelio con el antraceno; DC= después del contacto del micelio con el antraceno y CC= colonización completa de la colonia.

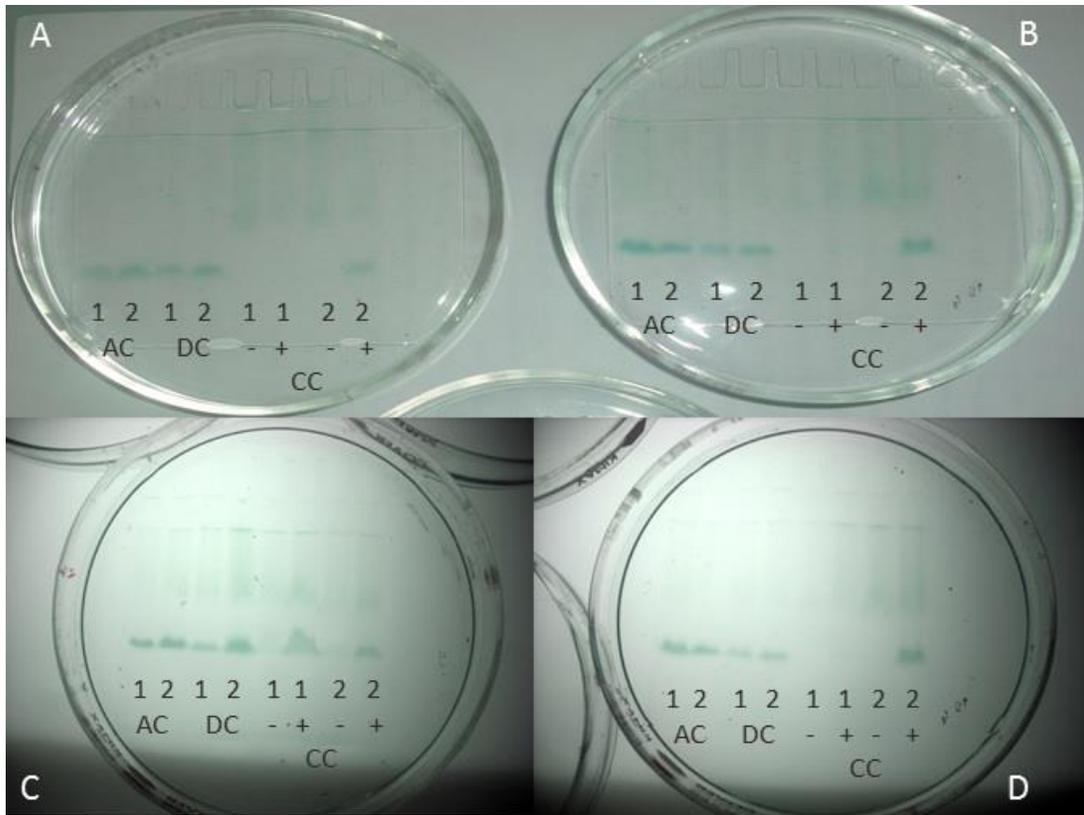


Figura 30. Patrón electroforético de lacasas producidas por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, tomando como referencia el Testigo (1= sin antraceno) y comparándolo con el tratamiento (2= con antraceno) con respecto a cada concentración de antraceno (A = 0.05, B = 0.1, C = 0.2 y D = 0.4 g de antraceno). Los signos (- y +) se describen en la **Figura 4**.

Cuantitativamente el experimento que mostro mejores resultados fue el tratamiento con 0.05 g de antraceno, tanto en menor tiempo en colonizar la caja Petri, como producir la mayor cantidad de proteínas. Colonizando la mayor parte de la caja Petri en 17 días y una producción de proteínas de $53.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el punto final del lado donde no contenía antraceno (CC-). Con respecto a la producción de lacasas el mejor experimento fue el tratamiento con 0.4 g de antraceno, dando 32.67 U mL^{-1} de lacasas en el punto antes del encuentro (AC). Se hace énfasis, que todos los experimentos con tratamiento mostraron el mismo comportamiento, dando mayor producción de proteínas y lacasas tanto antes que tocaran las hifas el antraceno; como cuando lo tocaban.

En los PAGES se logró distinguir que en los cuatro experimentos se presentaba una tendencia en el testigo; la cual era que a medida que transcurría el tiempo la

producción de lacasas disminuía, esto se observó en la desaparición de la banda en cada gel de la **Figura 30**. Sin embargo, caso opuesto en los tratamientos que la banda que nos denota la presencia de lacasas era constante y clara. A lo que se concluye que la producción de lacasas va a ser constante siempre y cuando haya un compuesto con nutrientes disponibles, en este caso la molécula del antraceno promueve la constante producción de lacasas aunque el crecimiento de la colonia se vea cualitativamente desgastada. El presente estudio demostró que la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* es capaz de crecer en presencia de diferentes concentraciones de antraceno. Esta característica puede ser útil para utilizarse en suelos altamente contaminados por este compuesto. En general se observó que la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* mantenía una tendencia al estar en contacto con el antraceno, dando una producción de proteína y lacasas mayor en un 25% entre condiciones expuestas (a mayor concentración, mayor producción de proteínas y lacasas). Esto principalmente se observó en el punto después que el micelio tenía contacto con el antraceno (DC) en todas las condiciones utilizadas. Además, en todos los casos el tratamiento mostró mayor producción de lacasas que en el testigo, el mejor ejemplo a esto fue en la condición con 0.2 g de antraceno donde el tratamiento produjo 22.04 U mL⁻¹, mientras que el testigo produjo 12.58 U mL⁻¹, lo que significa un 42.93% más que el testigo.

Diversos autores han mencionado la presencia de varias isoenzimas de especies de *P. ostreatus*. Con la secuenciación del genoma de *P. ostreatus*, se ha descubierto la presencia de 12 genes de lacasas. Sin embargo, hasta ahora sólo se han caracterizado bioquímicamente seis isoenzimas en esta especie (Giardina *et al.*, 1996, 1999). Recientemente, se han descrito dos nuevas isoforma de lacasas de *P. ostreatus* en cultivos en fermentación sólida, aunque no se han caracterizado (Iandolo *et al.*, 2011). Se ha descrito en estudios previos que la actividad de las lacasas es dependiente de las condiciones de cultivo (Patel *et al.*, 2009). Castanera *et al.* (2012), han demostrado que los genes de las lacasas están diferencialmente positivamente regulados dependiendo del cultivo de

fermentación sumergida y regulados negativamente por el cultivo en fermentación en medio sólido.

El gel nativo del PAGE aplicado en el presente trabajo mostro la existencia de diferentes isoenzimas de diferente peso molecular. La intensidad de las bandas es la misma en las cuatro concentraciones de cultivo en la toma de muestra de antes de contacto y después del contacto tanto en testigo como en los tratamientos, tal como se observa en la **Figura 30**. Sin embargo, en la toma de muestra de la colonización completa (CC), sólo una isoenzima fue constante, y esta fue en los tratamientos y en la zona donde estaba presente el antraceno.

8. CONCLUSIONES

El testigo con el que se comparó el tratamiento de 0.05 g de antraceno mostró la más rápida colonización de la cepa CP-50 de *P. ostreatus*, con una colonización en 17 días de 62.69 cm², mientras que el tratamiento fue de 58.34 cm², lo que representó un 5.96% de diferencia en dicha variable.

La mayor producción de proteínas fue en el tratamiento con 0.05 g de antraceno, produciendo 53.90 µg mL⁻¹, mientras que en el testigo se obtuvo 49.91 µg mL⁻¹, representando un 7.41% más que el testigo. Esta producción se obtuvo al finalizar la colonización del lado donde no contenía antraceno (CC-).

La mayor producción de lacasas se logró en el tratamiento con la mayor cantidad de antraceno (0.4 g), en la zona de contacto de la cepa con el antraceno (DC), obteniendo 32.67 U mL⁻¹, mientras que el testigo presentó 25.07 U mL⁻¹, lo que equivale a 23.27% más de enzima que el testigo.

Se detectó una isoenzima de lacasa en todas las condiciones usadas, tanto en el testigo como en el tratamiento en la toma de muestra, antes y después del contacto. Sin embargo, la aparición de una segunda isoenzima se presentó cuando el hongo colonizó completamente las cajas Petri del lado que contenía antraceno.

9. ESTRATEGIA PARA EL MANEJO Y APLICACIÓN DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCTORES DE LACASAS, EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN *IN SITU*, DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

9.1 Introducción

El trabajo de laboratorio que se desarrollo fue el esperado por las hipótesis que se tenían, dando como resultados datos importantes para el avance científico en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, esta fue una fracción de lo que implica una contaminación *in situ*, como las que se han desarrollado en comunidades cercanas al estado de puebla. Comunidades que a su vez por no tener el desarrollo científico tienen pérdidas considerables en sus campos productivos por motivos de accidentes latentes por empresas dedicadas al rubro de los óleos. La estrategia que se maneja en base a los resultados obtenidos en laboratorio es la utilización de microorganismos capaces de producir enzimas que ayuden a la desintoxicación de suelos contaminados, de una forma natural y sin perjuicios, ya que estos microorganismos que se proponen no son patógenos, y en base a toda la literatura citada se tiene la certeza que al estar en contacto con agentes tóxicos, estos no pierden su característica de ser inocuos. Debido a que estos microorganismos, en comparación con las células vegetales; no introducen sus nutrientes no sin antes haberlos transformado, con su potencial enzimático, en contraste con las células vegetales que en su caso absorben todo lo que se encuentre a su alcance produciendo la conocida bioacumulación.

En si la estrategia es promover los beneficios que tiene el consumo de organismos fúngicos y aprovechar al máximo todo el material que se ocupa para su obtención. Para evitar incertidumbre con el consumo de hongos crecidos en agentes contaminantes, por su posible toxicidad se promueve la utilización del desecho de composta (paja desgastada con micelio del hongo utilizado: *Pleurotus ostreatus*) en un proceso de biolabranza en espacios contaminados con hidrocarburos, produciendo así una nueva composta que nos ayudara a que se lleve más rápido el proceso de atenuación natural. Teniendo la seguridad que los

metabolitos secundarios que se produzcan a partir de esta composta serán digeribles y no tóxicos para las células vegetales que en un futuro se pudieran cosechar.

9.2 Actores de la estrategia

Los principales actores de la estrategia son instituciones gubernamentales con la capacidad de brindar el apoyo a comunidades con un bajo desarrollo tecnológico. Estas instituciones dedicadas a otorgar paquetes tecnológicos; otorgaran el conocimiento proveniente de instituciones dedicadas al desarrollo científico. Esto en conjunto con el recurso suficiente para recuperar espacios afectados con hidrocarburos. Comprometiendo a su vez a empresas dedicadas a este giro. Y de ésta manera promoviendo la importancia y el beneficio que conlleva el consumo de hongos comestibles.

1. El primer actor de la estrategia sería el campesino propietario del espacio contaminado por desastres con hidrocarburos.
2. El segundo actor de la estrategia sería las personas productoras de hongos comestibles. Éstos productores de hongos, serán relevantes siempre y cuando sean vecinos cercanos de las zonas afectadas con derrames de hidrocarburos.
3. En conjunto con el segundo actor las instituciones como el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla tendrían un gran impacto en la estrategia propuesta; ya que estas instituciones cuentan con la tecnología científica para el asesoramiento en la producción de especies de hongos comestibles con capacidad en producir enzimas esenciales para la biorremediación de espacios contaminados.
4. El cuarto actor primordial son las instituciones de gobierno como la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), así como otras instituciones capaces de brindar apoyo técnico, económico y administrativos a los agricultores y campesinos involucrados.

9.3 Estrategia manejo y aplicación de las cepas biorremediadoras

En el **Tabla 4**, se muestra los objetivos y actividades adecuadas para que se lleve a cabo la estrategia, para el uso eficiente y adecuado de la biorremediación de espacios contaminados con hidrocarburos en zonas rurales con un bajo desarrollo tecnológico.

Considerando que la estrategia es un conjunto de acciones prioritarias que establecen el camino elegido para alcanzar un objetivo (Silva, 2003). En las **Tablas 4, 5 y 6** se muestran las acciones propuestas para el cumplimiento de dicho objetivo, y así alcanzando estos logros pueden influir en un mejor ingreso económico para los productores y sus familias; procedentes de las regiones afectadas con desastres de tipo antropogénicos en base a un análisis FODA.

Tabla 6. Matriz de objetivos y actividades para desarrollar la estrategia.	
OBJETIVO GENERAL: “Promover la producción y consumo de hongos comestibles como <i>Pleurotus ostreatus</i> , bajo módulos de producción e introducir la cultura del beneficio que generan estos organismos; para zonas con problemas de contaminación de tipo antropogénicos. Generando beneficios tanto económicos como de salud”.	
Objetivo específico	Actividades para desarrollar la estrategia
“Buscar que con el sistema productivo de hongos comestibles (<i>Pleurotus ostreatus</i>) genere beneficios geobiológicos y económicos para las familias de zonas afectadas con derrames de hidrocarburos.”	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Realizar un programa de producción de hongos comestibles con capacidad de producir lacasas; en zonas aledañas al sitio contaminado con hidrocarburos. 2.- Proponer la integración de familias para construir y mantener módulos de producción con dimensión no mayor a 50 m² para autoconsumo y/o para su comercialización. 3.- Evaluar con precisión las bondades económicas de este cultivo para hacer un plan integral de siembra, que de mejores ingresos a las familias. Además de contar con el asesoramiento por parte de instituciones con desarrollo científico en la biorremediación con sustrato desgastado. 4.- Iniciar programas de capacitación para productores que integren un sistema de cultivo de hongos comestibles con potencial para producir considerablemente lacasas y poder desintoxicar las parcelas afectadas con hidrocarburos. 5.- Elaboración de manuales sobre la incorporación del sistema de producción de cepas comestibles con capacidad para producir lacasas, de tal forma que sea práctico y sencillo para los productores tanto la producción como el manejo de sus residuos.

Tabla 7. Causas y efectos del problema central identificado.	
OBJETIVO GENERAL	“Promover la producción y consumo de hongos comestibles como <i>Pleurotus ostreatus</i> , bajo módulos de producción e introducir la cultura del beneficio que generan estos organismos; para zonas con problemas de contaminación de tipo antropogénicos. Generando beneficios tanto económicos como de salud”.
OBJETIVO ESPECIFICO	“Buscar que con el sistema productivo de hongos comestibles (<i>Pleurotus ostreatus</i>) genere beneficios geobiológicos y económicos para las familias de zonas afectadas con derrames de hidrocarburos.”
RESULTADOS	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Aplicación de sustrato desgastado a las zonas afectadas con derrames de hidrocarburos. 2.- Programas y manuales para capacitar tanto a productores como campesinos. 3.- Supervisión permanente en cada etapa de la biorremediación.
ACTIVIDADES	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Realizar más trabajos de investigación para el proceso de bioaumentación; en base a determinar cómo interactúan las lacasas suspendidas en el sustrato desgastado, con el medio ambiente de la zona afectada. 2.- Generar una asociación de productores para obtener de forma más fácil ayuda por parte del gobierno y conseguir insumos a menores precios. 3.- Elaboración de folletos y manuales para el manejo adecuado del sistema de producción de hongos comestibles y el manejo de residuos desgastados. 4.- Capacitación a productores clave, para difundir el conocimiento.

Tabla 8. Matriz de análisis FODA.

<p>OBJETIVO ESPECIFICO: “Buscar que con el sistema productivo de hongos comestibles (<i>Pleurotus ostreatus</i>) genere beneficios geobiológicos y económicos para las familias de zonas afectadas con derrames de hidrocarburos.”</p>	<p>FORTALEZAS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gran aceptación de nuevas tecnologías por parte de las familias en zonas perjudicadas. - Cercanía a mercados locales. - Además de recuperar sus espacios contaminados generar un valor agregado extra. - Grandes beneficios a la salud, con el consumo de hongos comestibles. - Costos de producción bajos. - Buena eficiencia biológica. - Fácil adopción de la técnica tanto de producción como de biorremediación. 	<p>DEBILIDADES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Poco conocimiento sobre técnicas de producción de hongos comestibles. - Inversión inicial considerable. - Poco espacio disponible para la instalación de módulos de producción. - Falta de integración de la información existente, producto de investigaciones. - Incertidumbre en la interacción sustrato-suelo contaminado, con el ambiente. - Poca cultura para consumir hongos comestibles.
<p>OPORTUNIDADES</p> <ul style="list-style-type: none"> - El hongo comestible es un producto redituable en relación costo-beneficio - Extender especies de hongos comestibles con capacidad de biorremediación a mercados nuevos - Tener más información de este producto que arroje mayores y mejores resultados. - Tener tres ciclos de cosecha por unidad de producción. 	<p>POTENCIALIDADES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Existe un mercado potencial principalmente en el estado de Puebla y en el distrito federal. - Mercados alternos para el sustrato desgastado como alimento de rúmenes. - La transformación del producto es una alternativa de alcanzar nuevos mercados. 	<p>DESAFIOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lograr la integración por parte de productores, asociaciones y centro de investigaciones para generar más conocimiento y crear nuevas oportunidades de venta de las especies de hongos comestibles con capacidad de producir lacasas. <p>Controlar de forma eficiente los problemas por enfermedades en la etapa de producción, ya que puede causar pérdidas altas al grado de no generar ganancias e inclusive, recuperar la inversión de los insumos ocupados.</p>
<p>AMENAZAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Desinterés de productores por adoptar el sistema de producción de hongos comestibles como una alternativa de sustentabilidad. -Producción de baja calidad, por mala adopción de la técnica de producción. -Poco apoyo institucional para mejorar el programa de producción 	<p>RIESGOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - No tener un seguimiento por parte de los capacitadores. -No tener un mercado seguro. - Contaminación por otros organismos que causen el desinterés de los productores. 	<p>LIMITACIONES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pocos recursos económicos, humanos y espaciales para el establecimiento de un módulo de producción de hongos comestibles con capacidad de producir lacasas. - La mayoría de las personas afectadas no tienen conocimiento para solicitar un apoyo gubernamental.

10. LITERATURA CITADA

- Agudo A. (2010). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) acercamiento a su problemática como riesgo laboral. *Coordinación y Dirección: Secretaria de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT*. España pp. 133.
- Ander P., y K. Messner. (1998). Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques* 12 (3): 191-195.
- Andersson B. E., S. Lundstedt, K. Tornberg, Y. Schnürer, L. G. Öberg, y B. Mattiasson. (2003). Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (6): 1238–1243.
- Ball A, Jackson A (1995). The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. *Bioresource Technology* 54: 311–314.
- Benavides-López J., G. Quintero, A. L. Guevara, D. C. Jaimes, S. M. Gutiérrez, J. Miranda. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA Publicación Científica* 4 (5): 82-90.
- Bourbonnais R., M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, y S. Borneman. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4627-4632.
- Bradford M. (1996). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.
- Byss M., D. Elhottová, J. Tliska, P. Baldrian. (2008). Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study *Chemosphere* 73 (9): 1518-1523.
- Caramelo L., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2004). Search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving α -keto- γ -thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*. Humana Press Inc, New jersey.
- Castanera, R., G. Pérez, A. Omarini, M. Alfaro, A G. Pisabarro, V. Faraco, A. Amore and L. Ramírez. (2012). Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 78(11): 4037-4045.
- Cunninghama C. J., I. B. Ivshinab, V. I. Lozinskyc, M. S. Kuyukinab, J. C. Philpd. (2004). Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54 (2-3): 167-174.
- Dávila G., Vázquez-Duhalt. (2006). Enzimas Lignolíticas Fúngicas para Fines Ambientales. *Mensaje Bioquímico* 30: 29-55.
- Díaz R., M. Téllez-Téllez, C. Sánchez, M. D. Bibbins-Martínez, G. Díaz-Godínez, J. Soriano-Santos. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (4): 912–917.

- Esperanza-Ramírez N., M. C. Vargas, J. C. Ariza, C. Martínez. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5 (2): 64-72.
- Giardina P., P. Giardina, V. Aurilia, R. Cannio, L. Marzullo, A. Amoresano, R. Siciliano, P. Pucci and G. Sannia. (1996). The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry* 235: 508 –515.
- Giardina, P., G. Palmieri, A. Scaloni, B. Fontanella, V. Faraco, G. Cennamo, y G. Sannia. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry Journal* 341: 655– 663.
- Hartree E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48 (2): 422-427.
- Hernández y D.L. Lambert. (2010). A search for interstellar anthracene toward the *Perseus anomalous* microwave emission region. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 409 (2): 2157-2165.
- Hestbjerg H., P. A. Willumsen, M. Christensen, O. Andersen, y C. S. Jacobsen. (2003). Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (4): 692-698.
- Iandolo D., A. Piscitelli, G. Sannia y V. Faraco. (2011). Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry Biotechnology* 163: 40 –51.
- Iglesias-Groth S., A. Manchado, R. Reboló, J. I. González-Hernández, D. A. García - Hernández y D.L. Lambert. (2010). A search for interstellar anthracene toward the *Perseus anomalous* microwave emission region. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 409 (2): 2157-2165.
- Ko HG, Park SH, Kim SH, Park HG, Park WM. (2005). Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. *Folia Microbiologica* 50:103–106.
- Kumaran S, Sastry CA, Vikineswary S. (1997). Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. *World Journal Microbiology Biotechnology* 13:43–49.
- Kunamneni A., S. Camarero, C. García-Burgos, F. Plou, A. Ballesteros y M. Alcalde. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7, 32 doi: 10.1186/1475-2859-7-32.
- Lesser J., y S. Saval. (2001). Principales hidrocarburos contaminantes de suelos y acuíferos: identificación y características. *Teorema revista técnico-ambiental* 6 (23): 34-45.
- Lee C., J. Lee, J. Cheon, K. Lee. (2001). Attenuation of petroleum hydrocarbons in smear zones: A case study. *Journal of Environmental Engineering* 127 (7): 639-647.
- Martínez M. J., F. J. Ruiz-Dueñas, F. J. Guillén, A. T. Martínez. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237 (2): 424-432.
- Martínez-Carrera D., N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. (2010). Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. *Red*

Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. pp. 648.

- Matsubara M., J.M. Lynch, F. A.A.M. De Leij. (2006). A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (7): 1365-1372.
- Mayolo-Deloisa K, Trejo-Hernández MDR, Rito-Palomares M. (2009). Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry Journal* 44:435–439.
- Mazzocco-Spezia T. (2012). Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de bioremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México. *Tesis Doctoral*. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.
- Mougin C., (2002). Bioremediation and phytoremediation of industrial HAP-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Compounds* 22 (5): 1011- 1043.
- Novotny C., K. Svobodova, P. Erbanova, T. Cajthaml, A. Kasinath, E. Lang, V. Sasek. (2004). Lignolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1545-1551.
- Phan C-W. y V. Sabaratham (2012). Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Applied Microbiology Biotechnology* 96: 863-873.
- Patel, H., A. Gupte y S. Gupte. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by basidiomycetes fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources* 4: 268-284.
- Pardo-Castro J., L Perdomo-Rojas, M. C., J. L. Benavides-López de Mesa. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA Publicación Científica* 2 (2): 40-49.
- Placková M., K. Svobodová, T. Cajthaml. (2012). Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 71: 22-28.
- Ruiz-Herrera J. (2001). El asombroso reino de los hongos. *Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav* 20: 275-281.
- Silva L. I. (2003). Metodología para la elaboración de estrategias de desarrollo local. *Serie Gestión Pública ILPES-CEPAL* 42: 17-26, 41-43.
- Soriano R. R. (2004). Guía para realizar investigaciones sociales. *Plaza y Valdés, S.A. de C.V.* pp 437.
- Valdez-Vazquez I, J. Acevedo-Benitez, C. Hernandez-Santiago (2010) Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 2147-2153.

11. ANEXOS

11.1 Determinación del área por medio del programa *IMAGE J*.

Una vez que ya se tenían los archivos de las imágenes en la computadora, estos se abrían, haciendo click en el icono de “*File*”, y open. Ya que teníamos la imagen a analizar se configuraron las ventanas con las que se trabajarían, para facilitar la navegación entre ellas. Dentro de la barra de herramientas se abrió una lupa (*Magnifying glass*), lo cual ayudó a ajustar el tamaño de la imagen para facilitar los trazos que posteriormente se realizaran. El siguiente paso fue la calibración con respecto a un punto conocido, para lo cual se utilizó la regla que se tomó en la fotografía. Para ello, dentro de la barra de herramientas se abrió el icono de una línea recta (*Straight*), que al darle clic nos dio la opción de trazar una línea recta dentro de la imagen, esta línea se trazó sobre la regla y que correspondía a 1 cm., para hacer más preciso el cálculo. Después, se presionó el botón *Analyze* dentro de la barra de herramientas, el cual abrió la ventana de *Set scale* como se muestra en la **Figura 31**. En esta ventana se modificó *Known distance*, con la unidad de referencia que se utilizó en este caso fue de 1 y en el apartado de *Unit of length* se colocó las unidades utilizadas (cm), al final se le dio aceptar. De esta forma se calibro cada imagen a analizar dentro del programa, posteriormente se seleccionó el icono de un polígono (*Polygon selections*) el cual nos permite trazar múltiples puntos dentro de la imagen que al cerrar una área determinada se pueden modificar los puntos arrastrándolos al borde de la colonia. Cuando ya se tuvo el trazo deseado nuevamente se presiona el botón de *Analyze* para desprender un menú de opciones donde se encuentra *Measure*, los presionamos y nos desprendió una nueva ventana donde se van acumulando los resultados de cada imagen analizada con el programa. Dentro de esta ventana se encuentra el resultado expresado en cm^2 . En la siguiente imagen podemos observar un ejemplo del proceso antes mencionado.

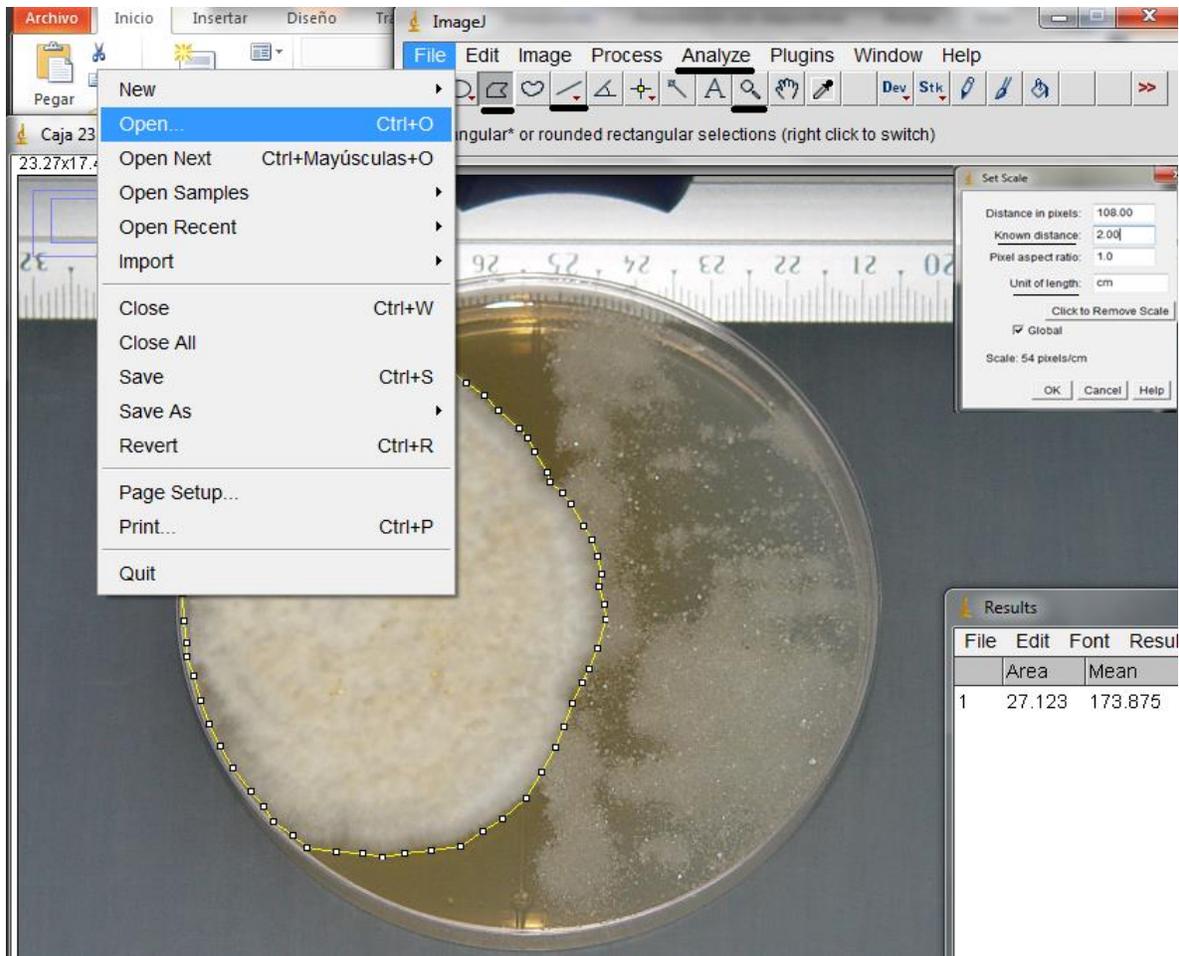


Figura 31. Ejemplo de las herramientas del programa *Image J*. Al fondo se observa la cepa 50 después del punto de encuentro con el antraceno.

11.2 Procedimiento para la determinación de proteína por el método Bradford.

Lo primero que se realizó fue preparar el BSA con una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para preparar la solución Stock de albúmina bovina con concentración 1.42 mg/ml fue necesario pesar 2 mg de albúmina bovina y disolverla en 1.5 mL de agua destilada hervida, y aforarla a 2 mL .

Para facilitar los cálculos finales se realizó una segunda solución stock que contenía $500 \mu\text{g/}$ en $500 \mu\text{L}$; para llegar a esta concentración se utilizó la fórmula de $C_1V_1=C_2V_2$. La cual al despejarse obtuvimos que $V_1=C_2V_2/C_1$. Sustituyendo los valores teníamos que; $V_1= (500 \mu\text{g} * 500 \mu\text{l}) / 1420 \mu\text{g} = 176.05 \mu\text{l}$. A partir de la solución Stock de $1.42 \mu\text{g/mL}$, se toma $176.05 \mu\text{L}$ y se disuelve en $323.95 \mu\text{l}$ de agua destilada estéril; para llegar a una concentración de $(500 \mu\text{g/}$ en $500 \mu\text{L})$.

Una vez que se tenía nuestra segunda solución (albúmina a 500 µg/ en 500 µL) se procedió a preparar la curva de calibración mediante la conformación de diferentes diluciones. Dichas diluciones tendrían una concentración conocida como se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Curva de calibración con BSA concentración 500 µg/500 µl.					
Concentración Solución Estándar		Solución Stock (500 µg/500 µL)		H ₂ O (mL)	
(µg ml)	(mg mL)	(mL)	(µl)	(mL)	(µl)
10	0,01	0,01	10	0,49	490
20	0,02	0,02	20	0,48	480
40	0,04	0,04	40	0,46	460
60	0,06	0,06	60	0,44	440
80	0,08	0,08	80	0,42	420
100	0,1	0,1	100	0,4	400

A continuación se describe como se preparó la curva de calibración (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg mL). Las soluciones que se desarrollaron se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. En el primer tubo rotulado con 0 y/o blanco se agregó 500 µl del medio de cultivo líquido con el que se trabajó todo el experimento o agua destilada estéril; posteriormente se homogenizó cuidadosamente y se colocó en un porta tubos para su posterior uso. En el segundo tubo rotulado con 10 se agregó 10 µl de solución stock a 500 µg mL de BSA. Después se homogenizó con 490 µl de agua destilada estéril; y de igual forma se colocó en el porta tubos. En el tercer tubo rotulado con 20 se agrega 20 µl de solución stock a 500 µg mL de BSA. Después se agrega 480 µl de agua destilada estéril; homogenizar bien y resguardar para su posterior uso. En el cuarto tubo rotulado con 40 se agregó 40 µl de solución stock a 500 µg mL de BSA. Para después homogenizarlo con 460 µl de agua destilada estéril.

En el quinto tubo rotulado con 60 se agregó 60 µl de solución stock a 500 µg mL de BSA. Después se colocó 440 µl de agua destilada estéril; se homogenizó bien y de igual forma se colocó en el porta tubos. En el sexto tubo rotulado con 80 se agregó 80 µl de solución stock a 500 µg mL de BSA. Después se añadió 420 µl de agua destilada estéril; para homogenizarlo bien y resguardar

en el porta tubos. En el noveno tubo rotulado con 100 se agregó 100 μl de solución stock a 500 $\mu\text{g mL}$ de BSA. Después se agregó 400 μl de agua destilada estéril; de igual forma se homogenizó bien y coloco en el mismo lugar.

El siguiente proceso fue el colocar 80 μl de muestra en cada pozo en la placa de 96 pozos para lectura al EPOCH. En las primeras tres columnas se colocó la curva de calibración de la fila A hasta la H. La lectura se realizó por triplicado; por lo cual fue necesario utilizar los tres pozos horizontales correspondientes a cada muestra. En la **Figura 32** se muestra una placa para darse una idea del orden en el que colocaron las muestras.

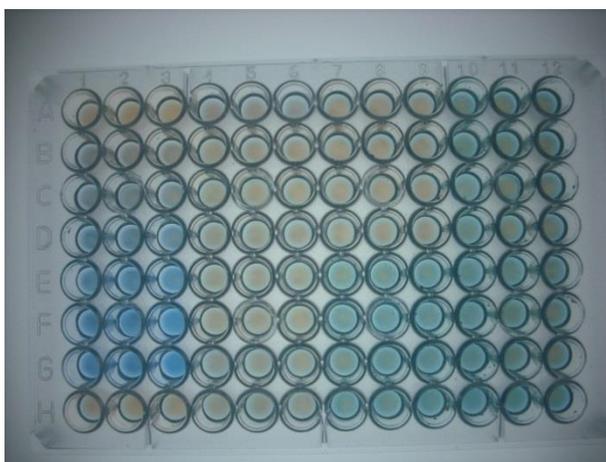


Figura 32. Placa de 96 pozos para lectura al espectrofotómetro, donde se ejemplifica los colores que se pueden observar al agregar las muestras y el colorante.

Del pozo 1A al 3A se agregó 80 μl de blanco con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1B al 3B se colocó 80 μl del tubo rotulado con la leyenda 10 con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1C al 3C se añadió 80 μl del tubo rotulado con la leyenda 20 con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1D al 3D se colocó 80 μl del tubo rotulado con la leyenda 40 con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1E al 3E se agregó 80 μl del tubo rotulado con la leyenda 60 con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1F al 3F se colocó 80 μl del tubo rotulado con la leyenda 80 con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1G al 3G se añadió 80 μl del tubo rotulado con la leyenda 100 con ayuda de una micropipeta. Del pozo 1H al 3H se agregó 80 μl del blanco con ayuda de una micropipeta.

A partir de las siguientes columnas se agregaron las muestras. De forma horizontal se colocó 80 μ l de muestra, de la columna 4 a la 6 se añadió un grupo de muestras, del 7 a la 9 otro grupo de muestras y de la 10 a la 12 otro grupo de muestras. Recordando que las muestras se analizaron por triplicado. A continuación se agregaron 20 μ l de colorante (Bio-Rad protein stains), por cada muestra fue necesario utilizar puntas nuevas, para que al verter el colorante se pudiera homogenizar cada muestra. Para evitar desperdiciar colorante se tomaron 2 mL aproximadamente del colorante y se colocaron en el recipiente especial para micropipeta multicanales. Después fue necesario calibrar la micropipeta multicanales y ajustar las puntas a utilizar; para posteriormente tomar los 20 μ l de colorante. Después se colocó el colorante en su pozo correspondiente y se homogenizó oprimiendo el gatillo tres veces; procurando no hacer burbujas.

En caso de que se produjera burbujas se eliminaron con ayuda de un alfiler metálico convencional. Al finalizar de colocar el colorante se dejó reposar 30 minutos para posteriormente leer las muestras a 595 nanómetros al espectrofotómetro (EPOCH). Por medio del programa predeterminado del espectrofotómetro UV (EPOCH) "protocolo protein stains" se dio lectura a la placa. Cuando finaliza de hacer la lectura el programa nos desfasa una tabla de resultados; los cuales se deben exportar al programa Excel por medio del icono directo. Después se exportó la curva y la fórmula combinada que encontramos en el apartado de graphics. Una vez exportada la información, se guardó para su posterior análisis.

11.3 Lectura al EPOCH para la determinación volumétrica de lacasas

Por columna se agregó 20 microlitros de agua en los pozos (A y E); que se tomaron como referencia para el blanco. Después se colocó 20 microlitros de muestra en cada pozo; cada muestra se analizó por triplicado en los pozos (B, C, D y F, G, H). Esta acción se realizó por columna, ya que el protocolo establecido por el programa del equipo EPOCH así lo requiere. Los primeros 3 pozos para una muestra y los otros 3 para la otra, con sus respectivos blancos.

Después de haber colocado las muestras se agregó 20 microlitros de sustrato ABTS en cada pozo por columna; con ayuda de la micropipeta multicanales para que iniciara la reacción. Una vez eyectado el sustrato, sin retirar de la posición de eyección, se homogenizó absorbiendo y eyectando tres veces como se muestra en la **Figura 33**.



Figura 33. Figura de la forma de agregar el sustrato ABTS con ayuda de la micropipeta multicanales, del pozo A al H; por columna.

Una vez agregado el sustrato fue necesario que se diera lectura lo antes posible a 420 nanómetros, para evitar un sesgo en la lectura, ya que la reacción de las lacasas se lleva a cabo en cuestión de segundos. Para realizar el punto anterior con el menor tiempo posible fue necesario estar preparado con el programa del equipo EPOCH abierto minutos antes de iniciar la práctica, teniendo precaución de que la computadora no se fuera a un estado de hibernación, ya que al realizar esta acción la computadora desconoce el equipo y es necesario reiniciar el sistema. Una recomendación es ya tener listo el icono de leer muestra como se muestra en la **Figura 34**.

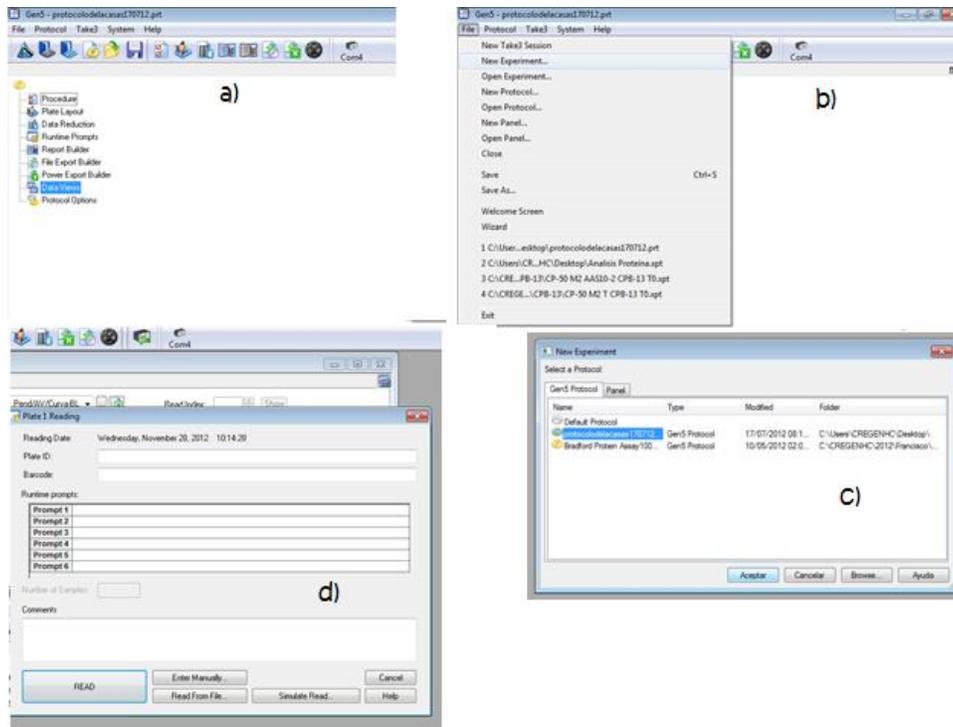


Figura 34. Figura para hacer la lectura de nuestras muestras con el espectrofotómetro. a) Abrir el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la máquina con el nombre de “protocolo para lacasas”. b) Abrir un nuevo experimento a partir de la pestaña “file”. c) Seleccionar el protocolo con el que se va a trabajar, en este caso sería “lacasses”. d) Presionar el botón de “run ensay”, este botón lo encuentran en la parte superior con el símbolo de una flecha color verde que apunta hacia la izquierda.

Después de transcurrir 8 minutos finalizaba cada lectura de la muestra por columna. Es importante tomar en cuenta que el protocolo del equipo está programado para hacer un proceso cada tres columnas, después de estas era necesario oprimir nuevamente el icono de leer muestra y presionar el botón de RESUME, lo cual nos indica seguir con el experimento. Finalmente los resultados arrojados por el programa se pudieron exportar a una hoja de cálculo Excel, a la cual se le realizaron las modificaciones y por supuesto resguardar el análisis.

11.4 Elaboración del gel de poliacrilamida nativo

Al inicio la prueba fue necesario preparar el sustrato ABTS de la siguiente manera: Pesar 0.00549 g (10 mM) de ABTS y disolver en 10 mL de alcohol etílico, Después se hizo el buffer de acetato de sodio 0.1 M pH5; de la misma manera como se ha descrito anteriormente. Después se preparó el buffer Tris 1.5 M pH 8.8, se pesó 18.17 g de TRIS y se disolvió en 50 mL de agua destilada estéril, se ajustó el pH a 8.8 con HCl 1N, posteriormente se aforó a 100 mL con agua destilada estéril. Posteriormente, se preparó el buffer TRIS 0.5 M pH 6.8; se pesó 6.06 g de TRIS y se disolvió en 50 mL de agua destilada estéril y se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1 N, finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada estéril. Otro reactivo que se preparo fue el persulfato de amonio (APS 10%); pasando 0.5 mg de APS y disolver en 5 mL de agua destilada estéril y se guardó a 4 ° C. Otro de los buffer que se preparo fue el de carga; para el cual fue necesario mezclar 2.5 mL de buffer de TRIS 0.5 M pH 6.8 con 2 mL de glicerol, y agregar 4 mL de agua destilada estéril más 3 mg de azul de Bromofenol. Se homogenizó bien y se aforo a 15 mL con agua destilada estéril. Finalmente se prepararon los buffers de corrida (cátodo y ánodo). El primero, se preparó con 60.57 g de TRIS, 28.52 g de glicina, y disolverlos para aforar en un 1 L de agua destilada estéril. Para el buffer de ánodo se pesó 12.1 g de TRIS para disolver y aforar en 1 L de agua destilada estéril.

Cuando se finalizó la preparación de las soluciones, se procedió a preparar el gel separador al 8% colocando 2,750.4 μ L de agua destilada estéril en un matraz kitasato de 125 mL, para después agregar 1,344 μ L de buffer TRIS 1.5 M pH 8.8, posteriormente se agregó 1,392 μ L de acrilamida (40%) más 48 μ L de APS (10%). Después de homogenizar y vertir la solución en el molde, se procedió a preparar el gel concentrador al 5%. Lo cual fue necesario colocar 1,391 μ L de agua destilada estéril en un matraz kitasato de 125 mL, después agregar 800 μ L de buffer TRIS 0.5 M pH 6.8, más 300 μ L de acrilamida (40%), más 14.6 μ L de APS (10%). De igual forma que el anterior gel fue necesario adaptar el matraz a una bomba de vacío y activarla aproximadamente un minuto para extraer todo el CO₂ y evitar la formación de espacios en el gel. A esta nueva solución se le agregó 2.9 μ L de

TEMED para verterlo sobre el primer gel en el molde. Finalmente se colocó el peine que forma los pozos en el gel, se dejó reposar durante treinta minutos para que polimerizara el gel.

11.5 Preparación de frascos de cristal

El principal objetivo de este apartado fue el elaborar un análisis cualitativo sobre el desarrollo del cuerpo fructífero de la cepa *Pleurotus ostreatus* en condiciones similares a las expuestas en la unidades experimentales anteriormente descritas, sólo que en este caso para poder observar el crecimiento se realizaron en frascos de cristal de 350 mL. Sólo a esta fase experimental se le agregó una variación; la cual partía de inocular en dos medios de cultivo diferentes, uno era el extracto de malta y el otro fue el CYM. Tomando en cuenta para cada tratamiento experimental se realizó su respectivo testigo. Cabe mencionar como fue sólo un análisis cualitativo únicamente se realizó el experimento con una concentración (0.05 g de antraceno).

Tabla 10. Relación de reactivos que se utilizan en g para preparar medio de cultivo enriquecido CYM.

Reactivo	1,000 mililitros	1,500 mililitros
Peptona de carne	2 g	3 g
Dextrosa	20 g	30 g
Extracto de levadura	2 g	3 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.5 g	0.75 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g	0.6 g
K ₂ HPO ₄	1 g	1.5 g
Agar	20 g	30 g

En el orden indicado en la **Tabla 10** se tienen que ir vertiendo para posteriormente llevarlo a ebullición por dos minutos, o hasta que sea claro el medio en un horno de microondas. Al finalizar esta fase se procede a medir 50 mL con ayuda de una probeta para colocar en cada frasco de cristal dicha cantidad de medio de cultivo y poder esterilizarlos en una olla de presión durante 20 min a 121 °C. Finalmente, se colocan los frascos en un lugar apropiado para la prueba de inocuidad durante 3 días.

11.5.1 Siembra de frascos de cristal

Cuando se cubrieron los puntos anteriores se procedió a preparar cada unidad experimental con sus respectivas repeticiones. Primero se colocó el papel celofán a siete frascos de cristal con medio de cultivo EMA y a siete con medio de cultivo CYM, con ayuda de unas pinzas para biología, previamente esterilizadas en una olla de presión a 121°C durante 20 minutos. En este punto es importante quitar el excedente de agua del papel celofán sacudiéndolo suavemente, para minimizar el riesgo de contaminación.

A los catorce frascos con el papel celofán cuidadosamente se les agregó un sobre que contenía antraceno. El antraceno se colocó en el lado opuesto al papel celofán. Después de haber agregado el antraceno, con las mismas pinzas para biología se procedió a retirar el papel celofán. Posteriormente, se les inoculó con la cepa 50 (*Pleurotus ostreatus*) mediante un inóculo estándar cortado con un popote plástico y una punta metálica. Los popotes se esterilizaron en una olla de presión a 121°C durante 20 minutos, y las puntas metálicas se esterilizaron directamente al fuego hasta que tuvieran una coloración de rojo intenso.

Primero se realizó el corte del inóculo con el popote, teniendo cuidado de no arrastrar el inóculo en el popote. Posteriormente con la punta metálica se tomó un inóculo circular y se colocó en un frasco de cristal con medio de cultivo, a una distancia homogénea y significativa para cada unidad experimental.

Al finalizar de inocular se les colocó papel parafilm a cada unidad experimental. Teniendo siete frascos con medio de cultivo EMA más 0.5 g de antraceno (Tratamiento 1), siete frascos con medio de cultivo EMA (Testigo 1), siete frascos con medio de cultivo CYM más 0.05 g de antraceno (Tratamiento 2) y siete frascos con medio de cultivo CYM (Testigo 2); cada uno con su respectivo inóculo de la cepa *Pleurotus ostreatus*. Finalizando el proceso con la rotulación de cada frasco con lo siguiente: cepa, unidad experimental, concentración y fecha. Y colocándolas en un espacio con las condiciones más homogéneas posibles, donde se pudiera monitorear la temperatura y crecimiento del inóculo hasta obtener el crecimiento del cuerpo fructífero de la cepa.

11.6 Resultados de inducción a fructificación

Inducción a fructificación donde obtuvimos; del medio de cultivo extracto de malta con 0.05 g de antraceno. En cinco de los siete frascos se observó un cuerpo fructífero con una media de 3 cm de largo, con pequeños carpóforos de escasos 2 mm. En la **Figura 35** se observa lo que se menciona anteriormente.



Figura 35. Fructificación en frascos con medio de cultivo EMA y 0.05 g de antraceno.

Con respecto al control del tratamiento se obtuvieron tres frascos con índices de fructificación, esto se debe al poco estímulo que tuvo el micelio en dos fases, la primera fue que el medio de cultivo en esencia no se encontraba enriquecido con malta, por lo que el hongo le costó más trabajo la absorción de nutrientes y el segundo factor fue que no se sintió estresado por un agente desconocido al medio quien perturbara su existencia provocando la rápida maduración del micelio, como en el caso del tratamiento.

Con respecto a las unidades experimentales con medio de cultivo CYM se tuvo un factor que nos contaminará la mayoría de los testigos, dejando sólo en observación dos frascos, uno mostrando fructificación y el otro no, sin embargo todo lo contrario pasó con el tratamiento ya que sólo se contaminó un frasco y manteniéndose disponibles para la total fructificación del medio, en este caso sólo tres frascos mostraron fructificar con las mismas características que con el EMA. En esta parte se llegó a la discusión que algunos de los reactivos que conformaban el medio de cultivo CYM ya estaban caducados, por lo cual afectarían su estructura y a su vez favoreciendo la fácil adopción al medio por

cualquier organismo. Algo que interviniera en el tratamiento sería los 0.05 g de antraceno añadidos a cada unidad experimental, haciéndolo un medio de cultivo selectivo. En la **Figura 36** se pueden observar los resultados obtenidos.



Figura 36. Fructificación en frascos con medio de cultivo CYM y 0.05 g de antraceno.