UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Instituto de Agroindustria

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PENTACLOROFENOL (PCF) POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

OLGA RUBILAR ARANEDA

TEMUCO – CHILE
2007

“Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca”

Esta tesis fue realizada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dra. MARÍA CRISTINA DIEZ JEREZ, del Departamento de Ingeniería Química y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

OLGA RUBILAR ARANEDA

Dra. MARÍA CRISTINA DIEZ J.

DIRECTOR PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

Dr. HELLMUTH LEAL L.

Dra. MARYSOL ALVEAR Z.

DIRECCIÓN DE POSTGRADO UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Dra. LORNA GUERRERO S.

Dra. GLADYS VIDAL S.

Dedico esta tesis a mis padres y hermanas

por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, un especial agradecimiento a la Dra. María Cristina Diez por la confianza, apoyo y estímulo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

Agradezco también al proyecto Fondecyt 1050614, Diufro 160605 y fundación Andes C-13755, por el financiamiento y recursos aportados para el desarrollo de esta tesis.

Al programa ALFA; Red INGAM (Ingeniería Ambiental), proyecto: Ciencias e Ingeniería para la protección ambiental, por el financiamiento de mi pasantía de investigación en la Universidad Santiago de Compostela en España. Al Dr. Gumersindo Feijoo por permitir realizar parte de esta tesis con su grupo de investigación en el Instituto de Investigación Tecnológica de dicha Universidad.

Agradezco además a todas las personas que contribuyeron de una u otra forma al desarrollo de esta tesis. En particular mis sinceros agradecimientos a Francisca Acevedo, Wilma Torres, Jorge Cabrera, Ingrid Cifuentes, Sergio Araneda, Pedro Parada, Lorena Leal y a mis amigos y compañeros Gonzalo Tortella, Mariela Bustamante, Gustavo Ciudad y Mara Cea.

Agradezco a mis padres, quienes han sabido crear y mantener mi inquietud, mi ambición y mis sueños.

RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca poseen un sistema enzimático oxidativo extracelular capaz de degradar compuestos orgánicos persistentes. Esta capacidad les permite ser utilizados en procesos de biorremediación de aguas y suelos contaminados. Sin embargo, el uso de estos hongos requiere la determinación de condiciones adecuadas para aumentar su crecimiento y expresión enzimática, en condiciones diferentes a su ambiente natural.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de degradación de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía de Chile, para ser aplicados en la biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF).

Se utilizaron 9 cepas de hongos de pudrición blanca los que fueron evaluados en relación a su potencial ligninolítico. Tres cepas fueron seleccionadas y cultivadas en medio líquido con dos concentraciones de nitrógeno (0,2 y 1,2 g/L) y con dos fuentes de carbono (glucosa y carboximetilcelulosa), para evaluar el efecto del medio de cultivo sobre la producción de las enzimas ligninolítica: manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa, versátil peroxidasa y lacasa (MnP, LiP, VP y lacasa). Posteriormente, se evaluó la remoción de PCF adicionado en dos etapas (50 y 100 mg/L) por el hongo con mayor producción enzimática. Se determinó el efecto de éstas sobre el proceso de degradación. Se utilizó *Phanerochaete chrysosporium* como cepa control para efectos comparativos.

Las cepas *Anthracophyllum discolor*, *Inonotus* sp. y *Stereum hirsutum*, fueron las que presentaron mayor potencial ligninolítico. El medio de mayor producción enzimática fue el constituido con glucosa y con la menor concentración de nitrógeno (0,2 g/L), siendo *A. discolor* la cepa que presentó mayor actividad ligninolítica. Una elevada remoción de PCF se obtuvo por *A. discolor* (90% en la primera etapa y 40% en la segunda etapa), después de 37 días de incubación. La actividad ligninolítica por la adición de PCF fue disminuida y no se observó correlación con la remoción de PCF.

Se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes materiales lignocelulósicos (paja de trigo, granos de trigo y viruta de madera) en el crecimiento de *A. discolor*. Se evaluó la biorremediación de suelo contaminado con PCF (250 y 350 mg/kg) utilizando *A. discolor* y *P. chrysosporium*, colonizado en granos de trigo. Se determinó el efecto de la microflora autóctona

del suelo y las características del suelo (suelo Andisol y Umbrisol) sobre la capacidad degradativa de *A. discolor* colonizado sobre granos de trigo.

Los granos de trigo utilizados como soporte lignocelulósico permitieron un mayor crecimiento y colonización por *A. discolor*. Así mismo, la aplicación de los hongos *A. discolor* y *P. chrysosporium* inmovilizados en granos trigo favoreció la propagación de los hongos en el suelo y por lo tanto la remoción del PCF (70-85%). La aplicación de granos de trigo en el suelo no inoculado, permitió la proliferación de microorganismos degradadores de PCF. Por otro lado, se observó un efecto sinérgico entre la microflora autóctona y *A. discolor* incrementando la remoción de PCF en los suelos. El pH del suelo influyó en la adsorción de PCF, siendo más elevada en suelos ácidos (Umbrisol). Además, los suelos ácidos redujeron la actividad de la enzima MnP de *A. discolor,* afectando la degradación de PCF.

Finalmente, se evaluó la degradación de PCF en suelo en fase *slurry* por *A. discolor.* Se evaluó el efecto de la concentración de PCF (100, 250 y 350 mg/kg), la fuente de carbono (glucosa y un material lignocelulósico proveniente de una planta de etanol, conocido como granos secos de destilería con solubles, conocidos como DDGS) y la acción de la microflora autóctona del suelo sobre la capacidad degradativa de *A. discolor*. Además, el proceso de degradación fue realizado en un reactor de tanque agitado a escala banco de 5 L con 250 mg/kg. Se utilizó *Bjerkandera adusta* como cepa control para efectos comparativos.

Una elevada degradación del PCF se obtuvo con *A. discolor* con DDGS (> 90% después de 28 días). La utilización de DDGS como fuente de carbono y nitrógeno incrementó la degradación de PCF y la producción enzimática ligninolítica en ambos hongos utilizados, aunque no se encontró una correlación entre estos dos parámetros. Por otra parte, se demostró que la microflora autóctona del suelo ejerció un efecto competitivo sobre los hongos de pudrición blanca, disminuyendo la degradación de PCF. La remoción de PCF en un reactor de suelo en fase *slurry* inoculado con *A. discolor*, no fue afectada por la concentración de sólidos y la agitación al interior del sistema, obteniéndose una remoción de 81% del PCF adicionado.

Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran que el hongos de pudrición blanca *A. discolor* presenta gran potencial para ser utilizado en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos persistentes.

ABSTRACT

The white rot fungi have an oxidative extracellular enzymatic system able to degrade persistent organic compounds. This ability allows using them in bioremediation processes of water and contaminated soil. However, the use of these fungi requires the determination of adequate conditions for enhancing their growth and enzymatic expression at different conditions from those found in their natural environment.

The general objective of this study was to evaluate the pentachlorophenol (PCP) degradation ability of white rot fungi isolated from forests of region of La Araucanía of Chile, to be applied in the bioremediation of soils contaminated.

Nine strain of white rot fungi were evaluated in relation to their ligninolytic potential. Three strains were selected and cultivated in liquid medium with two nitrogen concentrations (0.2 and 1.2 g/L) and two carbon sources (glucose and carboximetilcellulose). The effect of these conditions was evaluated on the enzyme ligninolytic production, such as manganese peroxidase, lignin peroxidase, versatile peroxidase and laccase (MnP, LiP, VP and laccase). Later on, it was evaluated the ability of the fungus with greatest enzymatic production to remove PCP added in two step (50 and 100 mg/L), and its effect on the degradation process was determined. *Phanerochaete chrysosporium* was used as strain control for comparative effect.

The strains *Anthracophyllum discolor, Inonotus* sp. and *Stereum hirsutum* presented the highest ligninolytic potential. The major enzymatic production was obtained in the liquid medium with glucose and low nitrogen concentration (0.2 g/L). *A. discolor* presented the greatest ligninolytic activity. The highest PCP removal was shown by *A. discolor* (90 % in the first step and 40% in the second step), after 37 days of incubation. The enzymatic activity decreased and no correlation with the PCP removal was observed.

The effect of different lignocellulosic material (wheat straw, wheat grains and wood chip) on the growth of *A. discolor* was evaluated. The bioremediation of soil contaminated with PCP (250 and 350 mg/kg) by *A. discolor* and *P. chrysosporium* colonized in wheat grains was evaluated. The effect of both the autochthonous microflora and soil characteristic (Andisol and Umbrisol) on the degradation capacity of *A. discolor* colonized in wheat grains was determined.

The wheat grains used as lignocellulosic support allowed a greater growth and colonization by *A. discolor*. The application of *A. discolor* and *P. chrysosporium* immobilized in wheat grains

favored the propagation of the fungi in the soil; and therefore, the PCP removal (70-85%). The application of wheat grains in the not inoculated soil allowed the proliferation of microorganisms degraders of PCP. Therefore, a synergistic effect was observed between the autochthonous microflora and *A. discolor,* increasing the PCP removal in soil. The soil pH influenced the adsorption of PCP, with the greatest adsorption in acid soil (Umbrisol). Also, the acid soil reduced the MnP enzyme activity of of *A. discolor,* affecting the PCP degradation

Finally, the PCP degradation in the soil slurry phase by *A. discolor* was evaluated. The effect of PCP concentration (100, 250 y 350 mg/kg), the source carbon (glucose and lignocellulosic material from ethanol plants, dried distillers grains with solubles known as DDGS) and the action of autochthonous microflora of soil on the degradation capacity of *A. discolor* were evaluated. Also, the degradation process was carried out in a stirred tank reactor of 5L with 250 mg/kg of PCP. *Bjerkandera adusta* was used as strain control for comparative effect.

The highest PCP degradation was attained by *A. discolor* using DDGS (95% after 28 days). DDGS increased the degradation of PCP and the production of ligninolytic enzymes in both fungi, although no correlation was found between them. The autochthonous microflora of soil elicited an inhibitory effect on the growth and degradation capacity of the two white-rot fungi, diminishing the PCP degradation. The PCP removal by *A. discolor* in a soil slurry phase reactor was about 81% and it was not affected by the concentration of solids and the agitation in the reactor.

The results obtained in this investigation, demostrated that the white rot fungus *A. discolor* presented a great potential to be used in bioremediation process of soil and water contaminated with persistent organic compounds.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 1
1.1 INTRODUCCIÓN 1
1.2 OBJETIVOS 4

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS 5
2.1 ASPECTOS GENERALES SOBRE EL PENTACLOROFENOL (PCF) 5
2.1.1 Propiedades físico- químicas 6
2.1.2 Distribución en el medio ambiente 7
2.1.3 Toxicidad 8
2.2 ESTRATEGIAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS 9
2.2.1 Biorremediación in situ 9
2.2.2 Biorremediación ex situ 10
2.3 BIODEGRADACIÓN DE PENTACLOROFENOL 11
2.4 HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA 12
2.4.1 Ventajas de la utilización de hongos de pudrición blanca en la biorremediación de suelos contaminados 13
2.4.2 Degradación de compuestos orgánicos persistentes por hongos de pudrición blanca 14
2.4.2 Enzimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca 15
2.4.3 Evidencia de degradación de pentaclorofenol por hongos de pudrición blanca 20
2.4.4 Degradación de pentaclorofenol: productos intermedios y reacciones involucradas 21

CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA, AISLADOS DE BOSQUES DE LA REGIÓN DE LA ARAUCANÍA Y SU POTENCIAL PARA LA REMOCIÓN DE PENTACLOROFENOL 26
RESUMEN 26
3.1 INTRODUCCIÓN 28
3. 2 MATERIALES Y MÉTODOS 29
3.2.1 Compuestos químicos 29
3.2.2 Microorganismos y medios de cultivo 29
3.2.3 Ensayos realizados a hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía 30
3.2.3 Metodología analítica 33

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37
3.3.1 Selección de hongos de pudrición blanca con potencial ligninolítico 37
3.3.2 Efecto de la fuente de carbono y concentración de nitrógeno sobre la producción enzimática ligninolítica de las cepas aisladas de bosques de la región de La Araucanía 38
3.3.3 Efecto de la concentración de PCF en la velocidad de decoloración del colorante Poly R-478 por hongos de pudrición blanca 43
3.3.4 Remoción de PCF por hongos de pudrición blanca 45
3.4 CONCLUSIONES 52

CAPÍTULO 4. BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PCF POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA 53
RESUMEN 53
4.1 INTRODUCCIÓN 54
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 56
4.2.1 Compuestos químicos 56
4.2.2 Microorganismos y medios de cultivo 56
4.2.3 Suelos utilizados 57
4.2.4 Preparación de los materiales lignocelulósicos y los suelos utilizados 57
4.2.5 Ensayos de biorremediación de suelos contaminados con PCF por la acción de hongos de pudrición blanca 58
4.2.6 Metodología analítica 60
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 62
4.3.1 Selección de material lignocelulósico para la colonización de hongos de pudrición blanca ... 62
4.3.2 Utilización de material lignocelulósico como substrato para el crecimiento de Antharcophyllum discolor y Phanerochaete chrysosporium 64
4.3.3 Remoción de PCF en un suelo Andisol, mediante la utilización de hongos, como micelio libre y colonizado en un soporte lignocelulósico 65
4.3.4 Efecto del tipo de suelo sobre la degradación de PCF por el hongo de pudrición blanca Anthracophyllum discolor 71
4.4 CONCLUSIONES 76

CAPÍTULO 5. BIODEGRADACIÓN DE PENTACLOROFENOL EN CULTIVOS CON SUELO EN FASE *SLURRY* POR *Bjerkandera adusta* Y *Anthracophyllum discolor* 77
RESUMEN 77

5.1 INTRODUCCIÓN 78
5. 2 MATERIALES Y MÉTODOS 80
5.2.1 Microorganismos 80
5.2.2 Suelo utilizado 80
5.2.3 Material lignocelulósico utilizado 81
5.2.4 Preparación de material lignocelulósico y del suelo utilizado 81
5.2.5 Ensayos de biodegradación de PCF en cultivos en suelo en fase slurry por Bjerkandera adusta y Anthracophyllum discolor 82
5.2.6 Metodología analítica 85
5. 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 86
5.3.1 Efecto de la concentración de PCF en la capacidad degradativa de Anthracophyllum discolor y Bjerkandera adusta en cultivos con suelo en fase slurry 86
5.3.2 Utilización de DDGS como substrato por Anthracophyllum discolor y Bjerkandera adusta ... 89
5.3.3 Efecto de la concentración de PCF en la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca en cultivos con suelo slurry con DDGS como substrato 92
5.3.4 Efecto de la microflora autóctona del suelo sobre la remoción de PCF en cultivos con suelo en fase slurry por Anthracophyllum discolor y Bjerkandera adusta 94
5.3.5 Identificación de productos de degradación 97
5.3.6 Remoción de PCF por Anthracophyllum discolor en reactor con suelo en fase slurry operado en modo batch 100
5.5 CONCLUSIONES 104

CAPÍTULO 6. DISCUSIONES GENERALES 106

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES 110

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

ANEXOS 130

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Pentaclorofenol y algunos de los contaminantes derivados de su producción ….……5

2.2 Rompimiento de una estructura no fenólica recalcitrante de la lignina, mediante la acción de la enzima LiP……...……...…… 15

2.3 Rompimiento de una estructura fenólica terminal de la lignina, por oxidación de la enzima MnP…….…….……16

2.4 Esquema hipotético para la oxidación de 2,4,6-triclorofenol (R=H) y PCF (R=Cl) por peroxidasas y lacasa …….. 21

2.5 Vía propuesta para la degradación de PCF por *P. chrysosporium*……..22

3.1 *Anthracophyllum discolor*, (a) en medio con Poly R-478 y en (b) medio con ABTS……...36

3.2 Actividad enzimática ligninolítica de *A. discolor* en cultivo con glucosa con N1 (0,2 g/L de tartrato de amonio) (a) y N2 (1,2 g/L de tartrato de amonio) (b), y con carboximetilcelulosa con N1 (c) y N2 (d)…….……...39

3.3 Consumo de glucosa (a) y carboximetilcelulosa (b) por *Anthracophyllum discolor* en medio de cultivo con N_1 y N_2 ……..…..……..40

3.4 Decoloración de Poly R-478 por *Anthracophyllum discolor* (a), *Stereum hirsutum* (b), *Inonotus* sp. (c) y *Phanerochaete chrysosporium* (d), en medio de cultivo con diferentes concentraciones de PCF…….……...42

3.5 Consumo de glucosa y producción de proteasas por *Anthracophyllum discolor* (a) y *Phanerochaete chrysosporium* (b)……....……..44

3.6 Concentración de PCF residual en medio de cultivo con *Anthracophyllum discolor* (a) y *Phanerochaete chrysosporium* (b). Sin aireación y con aireación intermitente (1,5 L/h de aire estéril por 2 minuto diario)…….…….…….45

3.7 Actividad enzimática ligninolítica de *Anthracophyllum discolor* en medio de cultivo líquido contaminado con PCF, sin aireación (a) y con aireación (b) y de *Phanerochaete chrysosporium* en medio contaminado con PCF sin aireación (c) y con aireación (d). ……..48

4.1 Colonización de material lignocelulósico por *Anthracophyllum discolor*. Paja de trigo (a), grano de trigo (b), viruta de pino (c) y control (d)……60

4.2 Micrografía electrónica de paja de trigo (a), grano de trigo (b) y viruta de madera (c). Imágenes a la izquierda baja resolución y derecha mayor resolución……61

4.3 Producción de MnP por *Anthracophyllum discolor* y *Phanerochaete chrysosporium* cultivados en medio con grano de trigo…….62

4.4 Concentración residual de PCF de diferentes concentraciones iniciales en suelo (250 y 350 mg/kg) utilizando *Anthracophyllum discolor* (a) y *Phanerochaete chrysosporium* (b) con hongo como micelio libre y colonizado en grano de trigo , por microflora del suelo (c) sin y con granos de trigo. Controles estériles (c)……...64

4.5 Actividad de la enzima MnP de *Anthracophyllum discolor* y *Phanerochaete chrysosporium* colonizados en granos de trigo e inoculados en suelo Andisol contaminados con PCF. ……69

4.6 Concentración residual de PCF en relación a los tratamientos: (a): adsorción, (b): remoción en suelo natural y (c): remoción por aplicación de *A. discolor* colonizado en granos de trigo. C: Controles estériles, A: suelo natural y B: suelo inoculado con *A. discolor* colonizado en granos de trigo; 1: Suelo Andisol (cultivo), 2: Suelo Umbrisol (cultivo) y 3: Suelo Umbrisol (forestal). ……70

4.7 Actividad de la enzima MnP de *Anthracophyllum discolor* colonizados en granos de trigo e inoculados en suelo Andisol, Umbrisol de cultivo y Umbrisol de uso forestal contaminados con PCF (250 mg/kg)…….73

5.1 Reactor de tanque agitado de 5 L……...…….82

5.2 Concentración residual de diferentes concentraciones iniciales de PCF en suelo (100, 250 y 350 mg/kg) utilizando un sistema con suelo en fase *slurry* con medio de cultivo Kirk por (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor*..……..…….85

5.3 Actividad enzimática de MnP. (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor*, en medio con suelo, DDGS, mezcla suelo-DDGS y suelo con medio Kirk……...……..88

5.4 Evolución del pH. (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor*, en medio con suelo, DDGS, mezcla suelo-DDGS y suelo con medio Kirk……..……...89

5.5 Concentración residual de diferentes concentraciones iniciales de PCF en suelo (100, 250 y 350 mg/kg) utilizando un sistema con suelo en fase *slurry* con DDGS como fuente de carbono por (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor*….…..……..91

5.6 Concentración residual de PCF en un sistema con suelo de fase *slurry*, con DDGS como sustrato después de 14 días (a) y 28 días (b) de tratamiento, empleando *Bjerkandera adusta* y *Anthracophyllum discolor*. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: Control abiótico (suelo estéril) (CTA1 y CTA2); Suelo estéril y *B. adusta* (A)*;* Suelo estéril y *A. discolor* (B)*;* Suelo no estéril sin hongo (C); Suelo no estéril y *B. adusta* (D); Suelo no estéril y *A. discolor* (E)……93

5.7 Evolución del pH en cultivos con suelo en fase *slurry* en suelo no estéril con *A. discolor*, *B. adusta* y suelo control (sin hongo)…….……94

5.8 Cromatograma de la degradación de PCF (250 mg/kg) y la formación de subproductos por *A. discolor* en cultivos con suelo en fase *slurry*……...95

5.9 Vía propuesta para la degradación para PCF en suelo en fase *slurry* por *Anthracophyllum discolor.* Compuestos destacados corresponden a los identificados por GC-MS……...97

5.10 Concentración residual de PCF, evolución del pH y concentración de glucosa en reactor con suelo en fase *slurry* inoculado con *Anthracophyllum discolor*…….……99

5.11 Decoloración de Poly-478 por *Anthracophyllum discolor* cultivado en reactor con suelo en fase *slurry* con PCF……...100

5.12 Formación de pellet de *Anthracophyllum discolor* en reactor con suelo en fase *slurry*……101

ÍNDICE DE TABLAS

2.1 Propiedades físico-químicas del pentaclorofenol……...6

2.2 Compuestos intermedios de la degradación de PCF por *P. chrysosporium*……..23

3.1 Medio de cultivo para la conservación de hongos de pudrición blanca……....27

3.2 Medio de mantenimiento agar extracto de malta (AEM) para hongos de pudrición blanca……28

3.3 Medio para la determinación de oxidasas (lacasa) de hongos de pudrición blanca…….28

3.4 Medio para la determinación de peroxidasas (MnP y LiP) de hongos de pudrición blanca……...29

3.5 Medio de cultivo Kirk modificado para hongos de pudrición blanca……...30

3.6 Decoloración de Poly R-478 y coloración de ABTS, por hongos de pudrición blanca……35

3.7 Máxima actividad enzimática ligninolítica (U/L ± D.S.) de hongos de pudrición blanca en medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono (10 g/L) con 0,2 g/L (N_1) y con 1,2 g/L (N_2) concentración de tartrato de amonio. Números entre paréntesis indican el día de máxima actividad enzimática……37

3.8 Máxima actividad enzimática ligninolítica (U/L ± D.S.) de hongos de pudrición blanca en medio de cultivo con carboximetilcelulosa como fuente de carbono (10 g/L) con 0,2 g/L (N_1) y con 1,2 g/L (N_2) concentración de tartrato de amonio. Números entre paréntesis indican el día de máxima actividad enzimática……38

3.9 Concentración total de PCF adicionado, residual y degradado por *A. discolor* y *P. chrysosporium*, bajo condiciones de cultivo sin aireación y con aireación intermitente……..46

4.1 Caracterización físico-química de los suelos……..55

4.2 Crecimiento de *Anthracophyllum discolor* en diferentes soportes lignocelulósicos después de 7 días de incubación……...60

4.3 Velocidad de remoción de PCF (250 y 350 mg/kg) durante los primeros 14 días de incubación (etapa 1) y los 14 días posteriores (etapa 2), en tratamientos con *A. discolor* y *P. chrysosporium*, como micelio libre y colonizados sobre granos de trigo (micelio en soporte)……65

4.4 Efecto de la aplicación de *A. discolor* y *P. chrysosporium* como micelio libre y colonizado en granos de trigo en la concentración de PCF (250 y 350 mg/kg) removido después de 28 días de tratamiento….....67

4.5 Remoción de PCF (concentración inicial de 250 mg/kg) en dos tipos de suelo mediante adsorción, por la microflora autóctona del suelo y por *A. discolor* inmovilizado en trigo……...71

5.1 Características físico-químicas del suelo de uso forestal……78

5.2 Composición química del DDGS……79

5.3 Máxima actividad MnP obtenida durante la degradación de PCF por *B. adusta* y *A. discolor* en cultivos en fase *slurry* usando medio Kirk modificado. También se muestra el tiempo en el cual se obtuvo la máxima actividad enzimática……..86

5.4 Máxima actividad MnP obtenida durante la degradación de PCF por *B. adusta* y *A. discolor* en cultivos con suelo en fase *slurry* usando DDGS como substrato. También se muestra el tiempo en el cual se obtuvo la máxima actividad enzimática……..92

5.5 Productos de degradación de PCF en suelo en cultivos con suelo en fase *slurry* por *A. discolor* identificados en GC/MS……..96

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

El pentaclorofenol (PCF), es un hidrocarburo aromático halogenado altamente tóxico y potencialmente cancerígeno (Kogevinas *et al.*, 1997), su utilización fue prohibida en Chile desde el año 1999. Este compuesto ha sido utilizado principalmente como preservante de la madera, y en menor cantidad como herbicida, fungicida, bactericida, entre otros (ATSDR, 2001). Es un contaminante altamente persistente en el ambiente (Chiu *et al.*, 1998), principalmente en el suelo, producto de inmovilización por adsorción y/o polimerización, pudiendo extenderse su efecto a través de la cadena alimenticia (Laine et al., 1995), provocando severos daños en la salud de las personas y en el ambiente, disminuyendo la abundancia y diversidad de especies en el ecosistema (Schonborn y Dumpert, 1990).

Actualmente existen numerosos mecanismos para el tratamiento de compuestos contaminantes en el suelo, tales como, tratamientos químicos e incineración. Los tratamientos químicos, aunque son factibles son problemáticos, ya que se producen grandes volúmenes de ácidos y de álcalis los que posteriormente deben ser dispuestos. La incineración es un método fisico-químico muy confiable para la destrucción de estos compuestos. Sin embargo, ha sido seriamente cuestionado, debido a la liberación de emisiones potencialmente tóxicas (Zhang y Qiao, 2002).

La aplicación de estos tratamientos físico-químicos es altamente costoso y algo ineficaz, por lo que el desarrollo de alternativas biológicas ha sido sujeto de gran interés científico. En este contexto, la necesidad de biorremediar los sitios contaminados ha potenciado el estudio de su biodegradación y el desarrollo de nuevas biotecnologías. El término biorremediación se define como uso de microorganismos (hongos o bacterias) naturales o introducido, para degradar los agentes contaminantes (Pointing, 2001). El metabolismo microbiano es probablemente el proceso más importante en suelos para la degradación de compuestos orgánicos persistentes (Zhang y Qiao, 2002), debido a que los microorganismos que los degradan, obtienen C, N o energía de las moléculas del contaminante para su consumo (Neilson *et al.*, 1990).

El objetivo de la biorremediación es reducir el agente contaminante a niveles imperceptibles, no tóxicos o aceptables, es decir dentro de los límites permisibles (Pointing, 2001) o mineralizarlo completamente hasta CO_2 y H_2O. Desde un punto de vista ambiental esta mineralización total representa la desintoxicación completa (Neilson *et al.*, 1990).

La biorremediación *in situ* permite tratar el suelo y las aguas subterráneas contaminadas sin la necesidad de excavación (Balba *et al.*, 1998, Zhang y Qiao, 2002), requiere poca energía y permite preservar la estructura del suelo (Hohener *et al.*, 1998). Sin embargo, la complejidad de los mecanismos microbianos para degradar los compuestos orgánicos persistentes, así como el periodo que se requiere para el proceso son las principales desventajas de este tratamiento (Nerud *et al.*, 2003), por lo que resulta evidente el estudio más detallado de los principios de la biodegradación y el desarrollo de métodos más eficaces para la tratamiento de suelos contaminados.

La degradación de PCF ha sido estudiada tanto por bacterias (Barbeau *et al.*, 1997, Antizar-Ladislao y Galil, 2003) como por hongos (Mileski *et al.*, 1988, Seiglemurandi *et al.*, 1992, McGrath y Singleton, 2000). Los hongos de pudrición blanca (*white rot-fungi*) han sido los más estudiados ya que son reconocidos por su capacidad para metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos persistentes (Mileski *et al.*, 1988, McGrath y Singleton, 2000, Choi *et al.*, 2002, Sedarati *et al.*, 2003, Rabinovich *et al.*, 2004, Tortella *et al.*, 2005, Boyle, 2006, Jiang *et al.*, 2006, Valentin *et al.*, 2006) y por demostrar una elevada capacidad degradativa, debido a que son más tolerantes a altas concentraciones del contaminante que las bacterias (Evans y Hedger, 2001). La elevada acción degradativa de hongos de pudrición blanca ha sido atribuida a su capacidad de secretar enzimas esenciales para la degradación de la lignina, tales como lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa, las cuales han demostrado ser capaces de transformar o mineralizar una amplia gama de compuestos orgánicos persistentes (Pointing, 2001, Aktas y Tanyolac, 2003, Bollag *et al.*, 2003). *Phanerochaete chrysosporium* (Reddy y Gold, 2000, Zouari *et al.*, 2002) y *Trametes versicolor* (Alleman *et al.*, 1992, Sedarati *et al.*, 2003) han sido los hongos mas estudiados en la degradación de PCF. Sin embargo, actualmente diversos estudios (Sato *et al.*, 2002, Levin *et al.*, 2004, Walter *et al.*, 2004) han sido orientados a encontrar y evaluar nuevas cepas fúngicas que podrían demostrar mayor potencial en procesos de degradación de compuestos orgánicos persistentes. El uso de estos hongos en la biorremediación de suelos contaminados requiere la determinación de las condiciones más adecuadas para su

crecimiento y activación del sistema ligninolítico en un medio que no corresponde a su hábitat natural (Leatham y Kirk, 1983) y la evaluación de cada cepa en particular, ya que cada una posee diferentes mecanismos y requerimientos de cultivo para la degradación de compuestos orgánicos persistentes (Leontievsky *et al.*, 2000, Rabinovich *et al.*, 2004).

En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía para ser aplicados en la biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol.

HIPÓTESIS

Los hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía, secretarán una elevada producción de enzimas ligninolítica (LiP, VP, MnP y/o Lacasa), las que estarán afectadas por las condiciones de cultivo en el medio. Estas enzimas serán esenciales para la degradación de PCF.

La colonización de hongos de pudrición blanca sobre un material lignocelulósico e inoculado en el suelo, permitirá una mayor acción degradativa de los hongos, los cuales actuarán en forma sinérgica con la microflora autóctona del suelo.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía, para ser aplicados en la biorremediación de suelos contaminado con pentaclorofenol.

Objetivos Específicos

- Determinar el potencial ligninolítico de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía.
- Evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la actividad enzimática ligninolítica, de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía.
- Evaluar un hongo de pudrición blanca como potencial inóculo para degradar PCF y determinar el efecto de las enzimas ligninolíticas sobre el proceso degradativo.
- Evaluar la biorremediación de suelos contaminados con PCF por hongos de pudrición blanca, en suelo en fase sólida y con suelo en fase *slurry*.
- Identificar algunos compuestos intermedios de la vía metabólica generadas durante la degradación de PCF.
- Evaluar el efecto de la aplicación de material lignocelulósico sobre la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca, en la biorremediación de suelos contaminados.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Aspectos generales sobre el pentaclorofenol (PCF)

El PCF es un compuesto fenólico clorado semivolátil. Se puede caracterizar como un compuesto orgánico estable que tiene baja solubilidad en agua y alta solubilidad en solventes orgánicos. Es una sustancia artificial, hecha de otros productos químicos o mediante procesos físicos y no se genera en forma natural en el medio ambiente (Rappe *et al.*, 1979)

El método más utilizado para la producción de PCF es el proceso Boehringer. El proceso Boehringer consiste en una reacción de cloración de fenol a elevada temperatura. Durante el proceso se generan diversos contaminantes tales como: triclorofenol, tetraclorofenol, hexaclorobenceno, dioxinas y furanos (Figura 2.1) (Rappe *et al.*, 1979), subproductos altamente tóxicos y con un alto riesgo ambiental (Altwicker, 1991).

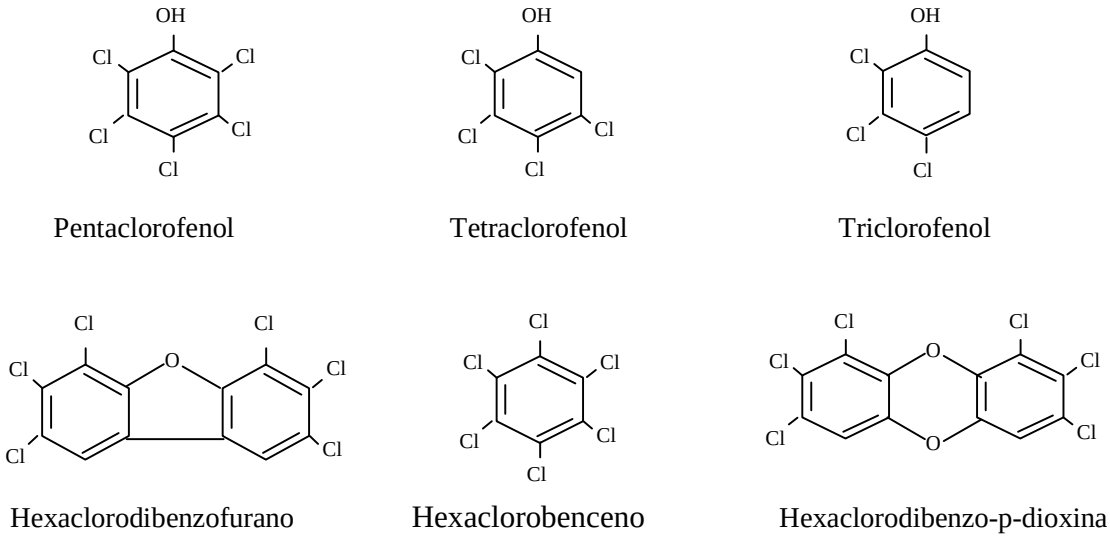

Figura 2.1. Pentaclorofenol y algunos de los contaminantes derivados de su producción

El PCF fue usado extensivamente en numerosos países como preservante de la madera para prevenir el crecimiento de hongos de la mancha azul, y en menor cantidad en la agricultura como, fungicida, bactericida, herbicida, algicida e insecticida (ATSDR, 2001). En Europa y Japón, el uso del pentaclorofenol fue prohibido desde 1988 (McAllister et al., 1996), mientras que en Chile el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) prohibió su importación y uso a partir de 1999. El principal motivo de la prohibición de este producto se debe a los efectos adversos en el medio ambiente que provoca este contaminante al igual que los productos derivados de su producción (Altwicker, 1991). Aunque el uso del PCF ha sido prohibido, todavía existen antiguos aserraderos que insisten en utilizarlo, provocando contaminación, tanto a los suelos, como a aguas subterráneas y sedimentos (McAllister et al., 1996 y Pointing, 2001). Por otra parte, producto de la persistencia de este contaminante en el suelo, la contaminación por prácticas anteriores, aún permanece latente (McAllister et al., 1996).

2.1.1 Propiedades físico- químicas

El PCF posee características que le confieren una alta capacidad como contaminante: baja solubilidad (14 mg/L) y mayor densidad que la del agua (1,98 g/cm^3) (Shiu *et al.*, 1994). Así mismo, su presión de vapor permite que se volatilice a partir de la madera tratada y su coeficiente de partición octanol/agua, que es de 5,05 (Shiu *et al.*, 1994), indica que esta sustancia puede acumularse en organismos y que tiene una alta afinidad por la materia orgánica, por lo cual es fuertemente adsorbido en la fracción orgánica del suelo no saturada (Cea *et al.*, 2005). Por otra parte, este compuesto tiene una baja constante de Henry, indicando una baja solubilidad en agua y movilidad a la fase gas. Estas propiedades pueden afectar fuertemente el comportamiento del contaminante en el suelo (Tabla 1.1).

Tabla 2.1. Propiedades físico-químicas del pentaclorofenol

Características	**Pentaclorofenol**
PM (g/mol)	266,3
Log K_{ow}	5,05
Solubilidad en agua[a] (mg/L)	14,0
Punto de ebullición[b] (ºC)	310
pK_a	4,75
Presión de vapor[a] (Pa)	0,0042
Constante de Henry (Pa m^3/mol)[b]	0,079

[a] 25ºC, [b] 760 mmHg, la constante de Henry fue calculada como la razón presión de vapor/solubilidad en agua a pH donde el PCF está en su forma molecular en solución acuosa. Adaptado de (Shiu *et al.*, 1994).

2.1.2 Distribución en el medio ambiente

El PCF se encuentra en todo el medios ambiente (aire, suelo, y agua) como resultado de su excesivo uso. A la atmósfera es liberado por volatilización y es transformado por fotólisis. En este medio el compuesto puede experimentar lentamente la oxidación del radical libre con un período estimado de aproximadamente 2 meses (ATSDR, 2001).

En las aguas superficiales, el PCF experimenta una biotransformación y fotólisis, que se lleva a cabo básicamente en la superficie del agua (Castillo y Bárcenas, 1998).

En suelos y sedimentos es metabolizado por microorganismos aclimatados, bajo condiciones aerobias y anaerobias, o fijado por adsorción (Dec y Bollag, 1994, D'Angelo y Reddy, 2000). La adsorción de los compuestos fenólicos clorados depende de las propiedades físico-químicas de estos (solubilidad en el agua, polaridad, entre otras) y de las propiedades del suelo (contenido de materia orgánica y arcilla, pH, permeabilidad, textura). Cuando se produce el fenómeno de adsorción, una parte del contaminante permanece disponible para su interacción con la biota y para su transferencia a corrientes de agua o aire. Un largo periodo de contacto entre el contaminante y el suelo favorece la formación de enlaces covalentes con el material húmico y la arcilla, dificultando su extracción y biodegradación (Bollag *et al.*, 1992). La adsorción del PCF

en suelos es dependiente del pH y ocurre principalmente en suelos ácidos (Cea *et al.*, 2005). Por lo tanto, el compuesto es más móvil en suelos neutros o básicos. La volatilización y la fotólisis no parecen ser procesos importantes en el transporte y la transformación del PCF en suelos. Todos estos procesos en conjunto determinan la persistencia del contaminante en el medio ambiente. En este contexto, el PCF tiene un período de vida media de aproximadamente 178 y 200 días en agua y suelo, respectivamente (Buyuksonmez *et al.*, 1999).

2.1.3 Toxicidad

El amplio uso de PCF, su elevada persistencia en el ambiente y su baja biodegradación, son las características principales que general un peligro potencial para la salud. Aunque la mayoría de la población no está expuesta directamente al PCF, puede haber exposiciones a bajas concentraciones de este compuesto en el ambiente de trabajo, en casas construidas con madera tratada (0,5-104 mg/m^3), por el aire, a través del agua potable (0,02 mg/día) y de los alimentos (0,1-6 mg/día) y por el contacto directo con madera tratada (ATSDR, 1989). Se han encontrado residuos de PCF en 79 % de las muestras de orina de grupos de población sin exposición específica (Murphy *et al.*, 1983); estos residuos provienen de los alimentos y el agua, ya que el PCF es un contaminante frecuente en productos agrícolas (USEPA, 1988). En estudios realizados por Gough (1991), para determinar residuos de plaguicidas en grasas animales, se encontró que el PCF es una de las sustancias detectadas con mayor frecuencia en las muestras de alimentos (35%).

El PCF es un compuesto lipofílico, persistente y acumulable y está considerado como uno de los contaminantes orgánicos prioritarios desde 1977 (USEPA, 1979). El efecto tóxico del PCF en los seres vivos se basa principalmente en un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, proceso básico de la respiración y además una inhibición de la enzima monooxigenasa P-450 (McAllister *et al.*, 1996).

La toxicidad de este compuesto, que afecta una amplia variedad de organismos, es desfavorable para la degradación (Chiu *et al.*, 1998). En el ser humano, la exposición al PCF puede ser por vía oral, dérmica y respiratoria; una vez absorbido, se distribuye en todo el organismo y tiende a acumularse en el hígado, riñones, cerebro y grasa (Braun *et al.*, 1977). La exposición aguda al

PCF provoca irritaciones locales, efectos sistémicos, reacciones alérgicas, alteraciones inmunológicas y gastrointestinales (ATSDR, 1989).

2.2 Estrategias para la biorremediación de suelos contaminados

Las tecnologías de biorremediación de suelos contaminados fueron desarrolladas para acelerar el proceso natural de la recuperación de suelos. Este efecto es logrado mediante la optimización de la capacidad natural de microorganismos para degradar un contaminante, proporcionando las condiciones esenciales para el crecimiento y la biodisponibilidad del contaminante, así como la reducción del estrés abiótico sobre la microflora (Vidali, 2001).

Se han empleado diferentes criterios a la hora de clasificar las estrategias de biorremediación de suelos contaminados. Si la eliminación de los contaminantes implica el uso de la microflora presente en el mismo sitio de la contaminación (microflora endógena), la biorremediación se considera como un sistema de tratamiento natural en el cual la acción del hombre se limita a estimular la acción de estos agentes mediante la adición de determinados nutrientes o aire. La estrategia más básica de biorremediación natural consiste en permitir que la microflora autóctona actúe sobre el contaminante sin ninguna intervención (Vidali, 2001).

Por otro lado, si se determina que la microflora autóctona del suelo no es suficientemente activa para degradar los contaminantes presentes, se hace necesario inocular microorganismos especializados en degradar el tipo de contaminante específico (microflora exógena) (Gentry *et al.*, 2004, Domde *et al.*, 2007).

Las tecnologías de biorremediación se han desarrollado para ser aplicadas *in situ* o *ex situ*, según la necesidad de mantener condiciones ambientales apropiadas para conseguir altas tasas de biodegradación de los contaminantes. En función de la estrategia empleada se describen a continuación las principales tecnologías de biorremediación de suelos.

2.2.1 Biorremediación in situ

Estas técnicas son generalmente las opciones más utilizadas, debido al bajo costo y a la poca intervención del suelo, ya que el tratamiento se realiza en el lugar, se evita la excavación y el transporte de contaminantes. Sin embargo, el tratamiento *in situ* es limitado por la profundidad del suelo. El oxígeno es uno de los factores de mayor importancia y que limita la eficacia del

proceso sólo a unos cuantos centímetros en la superficie del suelo. Los tratamientos más importantes son (Vidali, 2001):

Bioventilación o inyección de aire: Este consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno en la zona edáfica no saturada mediante pozos de inyección. Debido a la aireación del suelo, se va a favorecer la degradación de los hidrocarburos por dos motivos: por volatilización, facilitando la migración de la fase volátil de los contaminantes, y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se va a estimular la actividad microbiana. En estudios realizados para la remediación de suelos contaminados con tricloroetileno mediante esta técnica, se demostró una elevada degradación del contaminante (95%) (Sui *et al.*, 2006).

Biosparging: Es un método *in situ* que combina el efecto de la ventilación con la utilización de microorganismos autóctonos para degradar compuestos orgánicos adsorbidos por el suelo en la zona saturada. En el *biosparging*, el aire y los nutrientes se inyectan en la zona saturada para mejorar la actividad de los microorganismos presentes. Esta técnica se utiliza para la limpieza de los compuestos orgánicos en suelos y agua subterránea. Se ha demostrado la eficiencia del *biosparging* para la degradación de solventes clorados e hidrocarburos (Bass *et al.*, 2000).

2.2.2 Biorremediación ex situ

Esta alternativa es más rápida, fácil de controlar y ha sido empleada con éxito para tratar un amplio rango de contaminantes en diferentes tipos de suelos. Sin embargo, es necesaria la excavación y el tratamiento del suelo antes y algunas veces después de la etapa de biorremediación, por lo que presenta costos de operación superiores a los sistemas de biorremediación *in situ*.

Laboreo del suelo (*landfarming*): Es una técnica simple en la cual el suelo contaminado es excavado y extendido sobre una membrana impermeable. Posteriormente, el suelo es removido periódicamente hasta que se degradan los agentes contaminantes. El objetivo de este tipo de tratamiento es estimular la capacidad degradativa de los microorganismos autóctonos del suelo, mediante la aireación, el control de la humedad y la aplicación de nutrientes (Straube *et al.*, 2003).

Compostaje: Es una técnica que involucra la mezcla del suelo contaminado con residuos orgánicos, tales como abono y residuos agrícolas. La presencia de estos materiales orgánicos permite el desarrollo de una población microbiana y de una temperatura elevada (Ma *et al.*, 2003, Jiang *et al.*, 2006).

Biopilas: Es una mezcla entre la técnica laboreo de suelo y compostaje. Consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado y materia orgánica (compost) en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas de compost pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación.

Rectores con suelo en suspensión (*slurry*): La biorremediación con suelo en suspensión (o fase *slurry*) consiste en la mezcla de suelo contaminado con agua en un biorreactor, en el cual se adiciona nutrientes, microorganismos y aireación. El resultado de esta mezcla es una alta velocidad de degradación y un bajo periodo de tratamiento (Barbeau *et al.*, 1997, Quintero *et al.*, 2005, Quintero *et al.*, 2006).

2.3 Biodegradación de pentaclorofenol

Diversos grupos microbianos pueden transformar el PCF y compuestos orgánicos clorados en el suelo por múltiples vías. La eficiencia de la transformación, depende de condiciones ambientales, incluyendo el contenido de la materia orgánica (D'Angelo y Reddy, 2000), contenido de agua (Seech *et al.*, 1991), temperatura (Kohring *et al.*, 1989), oxígeno y aceptadores de electrones (D'Angelo y Reddy, 2000).

Bajo condiciones anaerobias, las bacterias puede transformar el PCF por dehalogenación reductiva, donde los átomos de cloro son secuencialmente reemplazados por átomos de hidrógeno, hasta la transformación a fenol, benzoato, acetato, CO_2 y CH_4 (Zhang y Wiegel, 1990). La decloración reductiva ha sido observada en una gran variedad de suelos, sedimentos y lodos metanogénicos (D'Angelo y Reddy, 2000). Algunos estudios han demostrado que durante el proceso anaerobio, se genera una acumulación de productos tóxicos intermedios de la reacción que interfieren con los aceptores finales de electrones (O_2, NO_3^-, Fe^{3+}), lo que podría limitar su aplicación como estrategia de remediación. Bajo condiciones aerobias, oxigenasas provenientes de bacterias y hongos pueden transformar el PCF por incorporación de uno o dos átomos de

oxígeno proveniente del O_2 diatómico, en la estructura del contaminante. Este proceso permite un rompimiento del anillo aromático y la consecuente formación de CO_2 (Leontievsky *et al.*, 2000, Reddy y Gold, 2000). La transformación aeróbica puede ser rápida para compuestos con bajo grado de cloración y muy lenta para compuestos altamente clorados, tal es el caso del PCF. Esto es debido a que el anillo aromático es deficiente en electrones y menos susceptible al ataque electrofílico por O_2 (Sahm *et al.*, 1986). Sin embargo, diversos estudios (Mileski *et al.*, 1988, Reddy y Gold, 2000, Choi *et al.*, 2002, Leontievsky *et al.*, 2002, Walter *et al.*, 2004) han demostrado que bajo condiciones aerobias, el PCF puede ser eficazmente degradado hasta una completa mineralización. En este contexto, los hongos de pudrición blanca han sido los más estudiados, producto de su elevada capacidad degradativa frente a compuestos orgánicos persistentes (Mileski *et al.*, 1988, Pointing, 2001, Leontievsky *et al.*, 2002, Valentin *et al.*, 2006).

2.4 Hongos de pudrición blanca

El nombre pudrición blanca (*white rot*) deriva de la apariencia de la madera una vez que es atacada por estos hongos, proceso en el cual la remoción de la lignina da lugar a un aspecto blanquecino del substrato (Pointing, 2001). La mayoría de los hongos de pudrición blanca son basidiomicetos, aunque algunos ascomicetos del género Xylariaceae son también capaces de generar pudrición blanca en la madera (Eaton y Hale, 1993).

En la naturaleza estos hongos viven en los tejidos de la madera que se componen principalmente de tres biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina que proporciona fuerza y estructura a la planta, es extremadamente recalcitrante. Se mineraliza en un proceso oxidativo y su degradación no genera energía neta (Pointing, 2001), porque no puede ser degradada como única fuente de carbono y nutrientes (Field *et al.*, 1993). La importancia fisiológica de la biodegradación de la lignina es la destrucción de la matriz que la forma, de modo que el microorganismo pueda tener un mejor acceso a la hemicelulosa y celulosa, que es de donde obtienen energía (Field *et al.*, 1993, Canet *et al.*, 2001).

La lignina es un polímero aromático, amorfo, heterogéneo, tridimensional y de baja viscosidad. Las características de este polímero hacen que sea altamente resistente a la degradación. Así mismo, debido a su tamaño molecular (600 - 1000 kDa) es imposible que la lignina sea absorbida y degradada intracelularmente, por lo que las enzimas ligninolíticas extracelulares desempeñan

un rol de vital importancia en la degradación de este polímero y por tanto en el reciclaje de carbono en el ambiente (Pointing, 2001). Así, los hongos de pudrición blanca se han convertido en un mecanismo no específico para degradar la lignina y a la vez compuestos que tienen estructuras aromáticas similares, tal como muchos compuestos orgánicos persistentes (Field *et al.*, 1993).

2.4.1 Ventajas de la utilización de hongos de pudrición blanca en la biorremediación de suelos contaminados

La aplicación de tecnologías fúngicas para la biorremediación de suelos contaminados ha sido utilizada desde 1985, cuando el hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* fue estudiado por su capacidad para metabolizar un importante número de compuestos orgánicos persistentes (Bumpus y Tatarko, 1994, Choi *et al.*, 2000, Chagas y Durrant, 2001). Esta capacidad es generalmente atribuida a un sistema enzimático ligninolítico (Reddy y Gold, 2000, Pointing, 2001, Bollag *et al.*, 2003).

Los hongos de pudrición blanca poseen una serie de ventajas para ser utilizados en procesos de biorremediación de suelos. El sistema enzimático ligninolítico capaz de degradar los contaminantes es extracelular, pueden degradar los productos químicos insolubles tales como lignina o una diversa gama de agentes contaminantes persistentes y/o tóxicos (Pointing, 2001).

El crecimiento miceliar de los hongos permite la colonización rápida de substratos y la extensión de las hifas permite traspasar la superficie del suelo y de esta manera pueden alcanzar agentes contaminantes de la forma que otros organismos no pueden hacerlo (Reddy y Mathew, 2001). Esto puede maximizar el contacto físico, mecánico y enzimático con el contaminante (Maloney, 2001). Además, estos hongos utilizan materiales lignocelulósicos de bajo costo como fuente de carbono y nutrientes (Walter *et al.*, 2004), pueden tolerar una amplia gama de condiciones ambientales, tales como temperatura, pH y niveles de humedad (Maloney, 2001) y no requieren el preacondicionamiento al contaminante (Barr y Aust, 1994).

Estas características son las ventajas más importantes de la utilización de hongos de pudrición blanca en procesos de biorremediación de suelos contaminados, lo que hace que el proceso degradativo sea altamente eficaz en comparación a otros microorganismos utilizados (Barr y Aust, 1994).

2.4.2 Degradación de compuestos orgánicos persistentes por hongos de pudrición blanca

Las principales enzimas implicadas en la degradación de la lignina y compuestos orgánicos persistentes secretadas por hongos de pudrición blanca son: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Reddy y Mathew, 2001) y en algunos hongos también se ha demostrado la presencia de versátil peroxidasa (VP) (Martinez, 2002). Estas enzimas rara vez se encuentran todas en un mismo organismo. Sin embargo, se ha demostrado que con diversas combinaciones se produce el mismo efecto, con respecto a la degradación de la madera (Pointing, 2001).

Las enzimas ligninolíticas son secretadas durante el metabolismo secundario, una vez finalizada la etapa de crecimiento (tropofase) del hongo (Gianfreda y Bollag, 2002). A su vez, se ha señalado que la concentración de nitrógeno afecta considerablemente la expresión enzimática. Leontievsky *et al.* (2000), indican que una concentración limitante de nitrógeno en el medio de cultivo induce la expresión enzimática ligninolítica, mientras que una elevada concentración promueve una completa o parcial inhibición de las enzimas. Leatham y Kirk (1983), demostraron que el efecto regulatorio de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, es una respuesta del efecto inductivo de los niveles de nitrógeno de la madera (C:N=200:1–1000:1). Sin embargo, se ha demostrado que la estimulación de las enzimas fúngicas por deficiencia de nitrógeno, no es una regla general (Rabinovich *et al.*, 2004). En *Pleurotus ostreatus* (Kamitsuji *et al.*, 2004), *Coriolopsis gallica* (Calvo *et al.*, 1998) y *Lentinus edodes* (Buswell *et al.*, 1995), la actividad es expresada principalmente en cultivos con elevada concentración de nitrógeno. Así mismo, el metabolismo y síntesis de las peroxidasas en *P. chrysosporium* es inducida por una fuente limitante de nitrógeno y la actividad lacasa en medio rico en nitrógeno (Srinivasan *et al.*, 1995).

Por lo tanto, no hay claridad del efecto de la fuente de carbono y nitrógeno, sobre producción de las enzimas ligninolíticas. Sin embargo, se cree que es una respuesta de un estrés oxidativo de los hongos inducido por las condiciones ambientales (Rabinovich *et al.*, 2004).

El principal efecto que provocan las enzimas ligninolíticas en compuestos contaminantes o bien durante la degradación de la lignina, es la formación de radicales libres intermedios que se forman cuando un electrón es removido o agregado de una estructura química en su estado mas estable (Reddy y Mathew, 2001). Estos radicales libres son altamente reactivos y tienden a aceptar o ceder un electrón de otro compuesto, lo que genera la oxidación o la reducción de

compuestos alternos. Estos radicales pueden realizar una variedad de reacciones incluyendo la oxidación alcohol benzyl, rompimiento de enlaces carbono-carbono, hidroxilación, dimerización /polimerización de fenol y demetilación (Pointing, 2001).

2.4.2 Enzimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca

Lignina peroxidasa (LiP)

La LiP fue la primera enzima descubierta en *P. chrysosporium* (Tien y Kirk, 1988) y es producida por muchos hongos, tales como: *Trametes versicolor, Bjerkandera* sp., *Irpex lacteus*, *Phlebia tremellosa*, entre otros (Kirk y Farrel, 1987, Kirby *et al.*, 2000, Novotny *et al.*, 2000).

Esta enzima es una hemeproteína extracelular, dependiente del H_2O_2, con un elevado potencial redox y un bajo pH óptimo (2,5), el que es controlado aparentemente por su ciclo catalítico (Gold y Alic, 1993). Por otra parte, la LiP es un fuerte oxidante y no solamente oxida los usuales sustratos de las peroxidasas tales como, fenoles y anilinas, sino que también una variedad de estructuras no-fenólicas y éteres aromáticos que se asemejan a las unidades estructurales básicas de la lignina (Tuor *et al.*, 1992). La oxidación de alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibenzil alcohol) dependiente de H_2O_2 a veratraldehído es la base para los ensayos estándares usados para detectar LiP en cultivos fúngicos (Tien y Kirk, 1988).

La oxidación catalizada por LiP, comienza con la extracción de un electrón desde el anillo aromático de un substrato donador y la especie resultante experimenta una variedad de reacciones post enzimáticas (Kirk y Farrel, 1987) (Figura 2.1). Por lo tanto, la LiP se considera un agente ligninolítico importante, que puede reaccionar con otros oxidantes pequeños que pueden penetrar y abrir la pared celular de la madera.

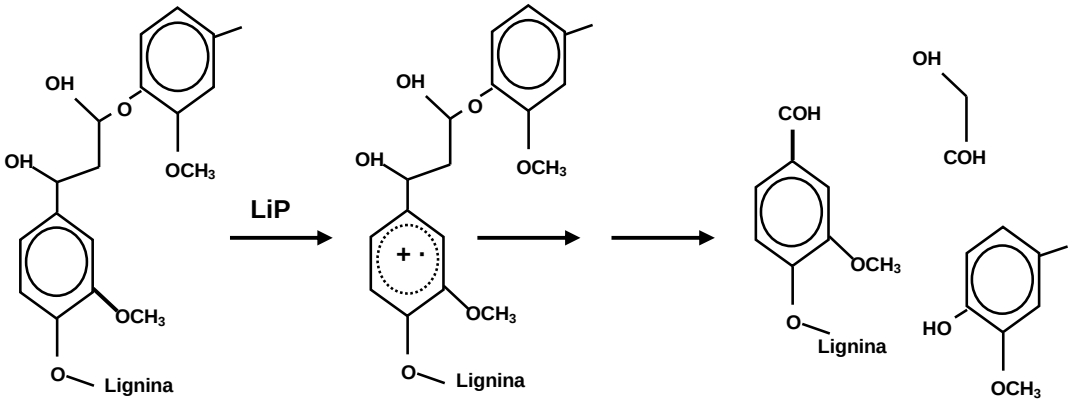

Figura 2.2. Rompimiento de una estructura no fenólica recalcitrante de la lignina, mediante la acción de la enzima LiP (Adaptado de Hammel (1996))

La interacción de LiP con un substrato es mediante un mecanismo *ping-pong*, donde el H_2O_2 oxida la enzima a través de dos electrones para obtener LiP I. Posteriormente, LiP I oxida substratos aromáticos (Ar) por un electrón para obtener LiP II, la que es oxidada nuevamente por el substrato aromático para llegar a su estado original (Esquema 1) (Cullen y Kersten, 2004).

$$\text{LiP} + H_2O_2 \longrightarrow \text{LiP I} + H_2O$$

$$\text{LiP I} + \text{Ar} \longrightarrow \text{LiP II} + \text{Ar}\bullet^+$$

$$\text{LiP II} + \text{Ar} \longrightarrow \text{LiP} + \text{Ar}\bullet^+ + H_2O$$

Esquema 1. Ciclo catalítico de la enzima LiP

Manganeso peroxidasa (MnP)

La principal función de la enzima MnP es la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+}, usando H_2O_2 como oxidante (Paszczynski *et al.*, 1992). Esta reacción requiere la presencia de un ácido orgánico quelante bidentado tales como, glicolato u oxalato, de modo que estabilicen el Mn^{3+} y promuevan la acción de la enzima (Rodakiewicz-Nowak, 2000). El Mn^{3+} es un oxidante débil, por lo que es incapaz de atacar las estructuras recalcitrantes no-fenólicas de la lignina. Sin embargo, el Mn^{3+} oxida las estructuras fenólicas más reactivas que componen aproximadamente el 10% de la

lignina. Estas reacciones dan lugar a un limitado grado de ligninolisis y otras reacciones degradativas (Figura 2.2) (Tuor *et al.*, 1992).

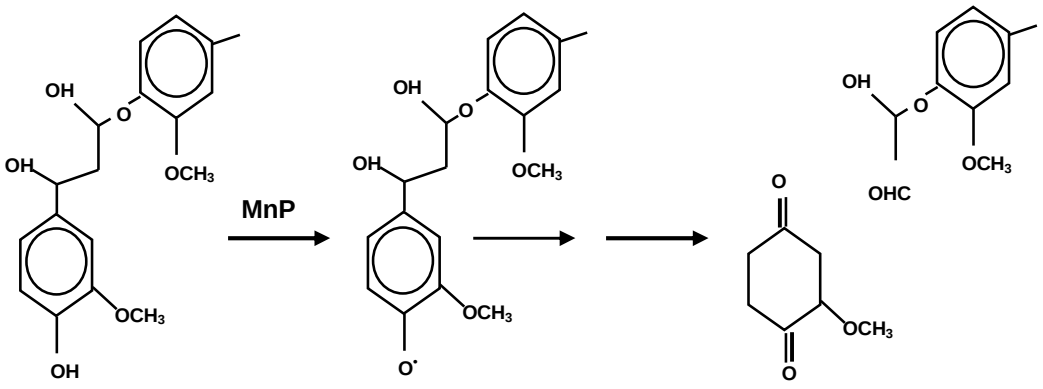

Figura 2.3. Rompimiento de una estructura fenólica terminal de la lignina, por oxidación de la enzima MnP (Adaptado de Hammel (1996))

Como se mencionó anteriormente, la oxidación de la lignina por acción de la enzima MnP, es dependiente del ión Mn. El primer substrato reducido en el ciclo catalítico de MnP es Mn^{2+} (Esquema 2). Luego, el Mn^{2+} reduce ambos estados de la enzima, MnP I y MnP II, generando Mn^{3+} el que posteriormente oxida el substrato orgánico. Ácidos orgánicos tales como oxalato y malonato son secretados por *P. chrysosporium* y estimulan la reacción de MnP por estabilización del Mn^{3+}, el que puede difundir desde la superficie de la enzima y oxidar los substratos terminales de la lignina (Kuan y Tien, 1993).

$$MnP + H_2O_2 \longrightarrow MnP\ I + H_2O$$

$$MnP\ I + Mn^{2+} \longrightarrow MnP\ II + Mn^{3+}$$

$$MnP\ II + Mn^{2+} \longrightarrow MnP + Mn^{3+} + H_2O$$

Esquema 2. Ciclo catalítico de la enzima MnP

Estudios con diversos hongos de pudrición blanca han demostrado que MnP parece ser más común que la LiP (Rodakiewicz-Nowak, 2000, Shin *et al.*, 2005), y en estos últimos años se ha estudiado extensivamente las características y el rol de la enzima MnP (Grabski *et al.*, 1998, Podgornik y Podgornik, 2004, Ruiz-Duenas *et al.*, 2007). La MnP desempeña un papel esencial en el depolimerización de la lignina y clorolignina, así como en la demetilación de la lignina y en el blanqueamiento de pulpa y papel. Por otra parte, la enzima puede iniciar la degradación de la lignina de elevado peso molecular (Crestini *et al.*, 2000, Papinutti *et al.*, 2003).

Versátil Peroxidasa (VP)

La VP difiere de la MnP y LiP por que es capaz de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de Mn^{2+} (Martinez *et al.*, 1996). Además, posee una alta afinidad hacia el Mn^{2+}, hidroquinonas y colorantes. También es capaz de oxidar al alcohol veratrílico (a veratril aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP (Heinfling *et al.*, 1998, Caramelo *et al.*, 1999). El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP. Sus características básicas son comunes a la mayoría de la peroxidasas. Sin embargo, la VP es única enzima capaz de oxidar sustratos aromáticos como el alcohol veratrílico (AV) a su correspondiente radical AV•, el Mn^{2+} a Mn^{3+} y sustratos que la LiP sólo oxida en presencia de alcohol veratrílico. El ciclo de la VP incluye la sustracción de dos electrones de la enzima en estado basal por el H_2O_2 para producir un radical catiónico (Martinez *et al.*, 1996).

Es importante mencionar que esta enzima oxida directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos, los cuales no son oxidados eficientemente por la LiP o la MnP en ausencia de alcohol veratrílico o Mn^{2+}, respectivamente. Incluso oxida colorantes de alto potencial redox, los cuales sólo son catalizados por la LiP en presencia de alcohol veratrílico (Heinfling *et al.*, 1998).

Estudios bioquímicos muestran la existencia de una inhibición no competitiva entre la oxidación de Mn^{2+}y los sustratos orgánicos, como colorantes de alto potencial redox (Ruiz-Duenas *et al.*, 2007) e hidrocarburos aromáticos (Wang *et al.*, 2003). Estos resultados apoyan la idea de la existencia de dos sitios de oxidación con afinidades distintas, que no se ven afectados por la presencia del sustrato alterno que actúa como inhibidor (Martinez *et al.*, 1996).

Lacasa

La lacasa es una fenol oxidasa que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua (Rodakiewicz-Nowak, 2000). Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias (Gianfreda *et al.*, 1999). Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares que poseen cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación que les confieren una coloración azul (Gianfreda *et al.*, 1999). La lacasa fúngica (bencendiol:oxígeno oxidorreductasa, E.C. 1.10.3.2) es una enzima extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos, siendo los mejores productores de esta enzima los hongos ligninolíticos (Gianfreda *et al.*, 1998).

La lacasa cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente (Gianfreda *et al.*, 1998). Esta enzima también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o depolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso molecular (Bourbonnais *et al.*, 1995). La lacasa en la presencia de un cosubstrato adicional o un mediador redox tales como, 2,2'–azinobis (3- etilbencenotiazolin 6-sulfonato) (ABTS) o hidroxibenzotriazol (HBT), degrada fenoles relativamente recalcitrantes en un proceso oxidativo involucrando el mediador y el substrato (Gianfreda *et al.*, 1999, Rodakiewicz-Nowak, 2000).

El mediador más ampliamente estudiado es el ABTS, un compuesto aromático sintético con substituciones nitrogenadas (Bourbonnais y Paice, 1990). El ABTS es oxidado por la lacasa a un catión radical estable ($ABTS^{\cdot +}$). Aunque, la reacción redox de ABTS y su radical han sido estudiados, el mecanismo de interacción con la enzima como mediador de la oxidación de la lignina es aún desconocido. Bourbonnais y Paice (1990) han demostrado que el ABTS actúa como un activador o co-oxidante de la enzima.

La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisoria para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, el blanqueo de la pulpa de papel (Bourbonnais *et al.*, 1995), decoloración de colorantes textiles y oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos (Rodriguez *et al.*, 1999).

2.4.3 Evidencia de degradación de pentaclorofenol por hongos de pudrición blanca

La degradación de pentaclorofenol, ha sido estudiada por hongos de pudrición blanca, tanto en medio líquido (Mileski *et al.*, 1988, Alleman *et al.*, 1992, Choi *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 2002, Sedarati *et al.*, 2003) como en suelo (Lamar y Dietrich, 1990, Okeke *et al.*, 1997, Tuomela *et al.*, 1999, McGrath y Singleton, 2000). Estudios realizados por Mileski *et al.* (1998) demostraron que *Phanerochaete chrysosporium* en medio líquido, con un crecimiento previo, es capaz de crecer y mineralizar el PCF hasta concentraciones inferiores a 500 mg/L. No obstante, con una aplicación directa del contaminante al inóculo, una muy baja concentración (4 mg/L) puede provocar efectos letales para el hongo. Así mismo, se ha demostrado que la toxicidad de PCF en hongos de pudrición blanca no tiene relación con la concentración del contaminante en el agua, sino que está dada por la dosis química, expresada como la razón entre la masa del químico y la masa de micelio (Alleman *et al.*, 1992).

Sedarati *et al.* (2003), estudiaron la degradación de PCF (2000 mg/L) y 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) (3400 mg/L) en medio líquido con *Trametes versicolor* en forma libre e inmovilizado en nylon. En el medio con biomasa inmovilizada se obtuvo una remoción de 85 y 70%, para 2,4-DCF y PCF, respectivamente. Mientras que con biomasa libre, solo se obtuvo una remoción de 20% para 2,4-DCF y 12% para PCF, observándose en ambos ensayos crecimiento del micelio, siendo 23% mayor en el ensayo con biomasa inmovilizada.

En ambos estudios se demostró que la cantidad de micelio en el medio influye en la degradación del contaminante. Sin embargo, el hongo a utilizar es de gran importancia al momento de aplicar un proceso de biorremediación, ya que cada uno posee mecanismos diferentes para la degradación del contaminante, expresada principalmente por el tipo de enzimas ligninolíticas expresadas (Rabinovich *et al.*, 2004).

Si bien, la degradación de PCF por hongos de pudrición blanca en medio líquido ha sido ampliamente demostrado, en el suelo la degradación es un proceso altamente complejo, donde existen interacciones, tales como: adsorción, polimerización y atrapamiento del contaminante en los micro y nanoporos del suelo, lo que determina la biodisponibilidad del contaminante a la acción fúngica (Dec y Bollag, 1994). Así mismo, en el suelo existe una gran cantidad de microorganismos saprófitos y la adición de hongos de pudrición blanca requiere un efectivo crecimiento para competir con la microflora autóctona del suelo (Canet *et al.*, 2001). En este

contexto, Okeke *et al.* (1997), estudiaron la degradación de PCF en suelo estéril y no estéril inoculado con *Lentinula edodes*. En ambos suelos la extracción de PCF al finalizar el tratamiento (10 semanas) fue entre 35 y 45%, de una concentración inicial de 200 mg/kg, por lo que una gran cantidad de PCF fue adsorbido a la fracción orgánica e inorgánica del suelo. De la fracción biodisponible al ataque fúngico, removió un 99% del PCF en el suelo estéril, mientras que en suelo no estéril sólo un 42%.

La degradación de PCF en suelo ha sido realizada por diversos hongos los que han demostrado diferentes capacidades para degradar el PCF. Al respecto, *P. chrysosporium*, *P. sordida*, *Trametes versicolor*, entre otros, han sido estudiados extensivamente en procesos de biorremediación por su efectiva producción de enzimas ligninolíticas y elevada tolerancia al PCF (Lamar y Dietrich, 1990, Tuomela *et al.*, 1999). Sin embargo, las condiciones ambientales del suelo, tales como el pH, la microflora autóctona del suelo, el tipo de suelo, entre otras, no han sido estudiadas en detalle, lo que podría ser de gran importancia en la velocidad de degradación.

2.4.4 Degradación de pentaclorofenol: productos intermedios y reacciones involucradas

La transformación de clorofenoles por basidiomicetos produce una elevada mineralización (50-70%) (Valli y Gold, 1991, Leontievsky *et al.*, 2000, Reddy y Gold, 2000). En la Figura 2.3 se presenta el primer paso de la oxidación de clorofenoles con la formación de *para*-quinona y la consecuente liberación de un átomo de cloro. En este proceso participan las enzimas extracelulares lacasa y peroxidasas, y la decloración es causada por la inserción de uno o dos grupos OH en el anillo en la posición donde el átomo de cloro es liberado (Gianfreda y Bollag, 2002).

Las variadas reacciones durante la degradación de clorofenoles generan diversos productos e intermediarios. El primer paso es catalizado por las enzimas extracelulares, seguida por la acción de otras enzimas y por la presencia de factores abióticos. En esta materia, Dec y Bollag (1994), han demostrado que hay factores abióticos, tales como, la degradación fotoquímica que también provocan la dehalogenación.

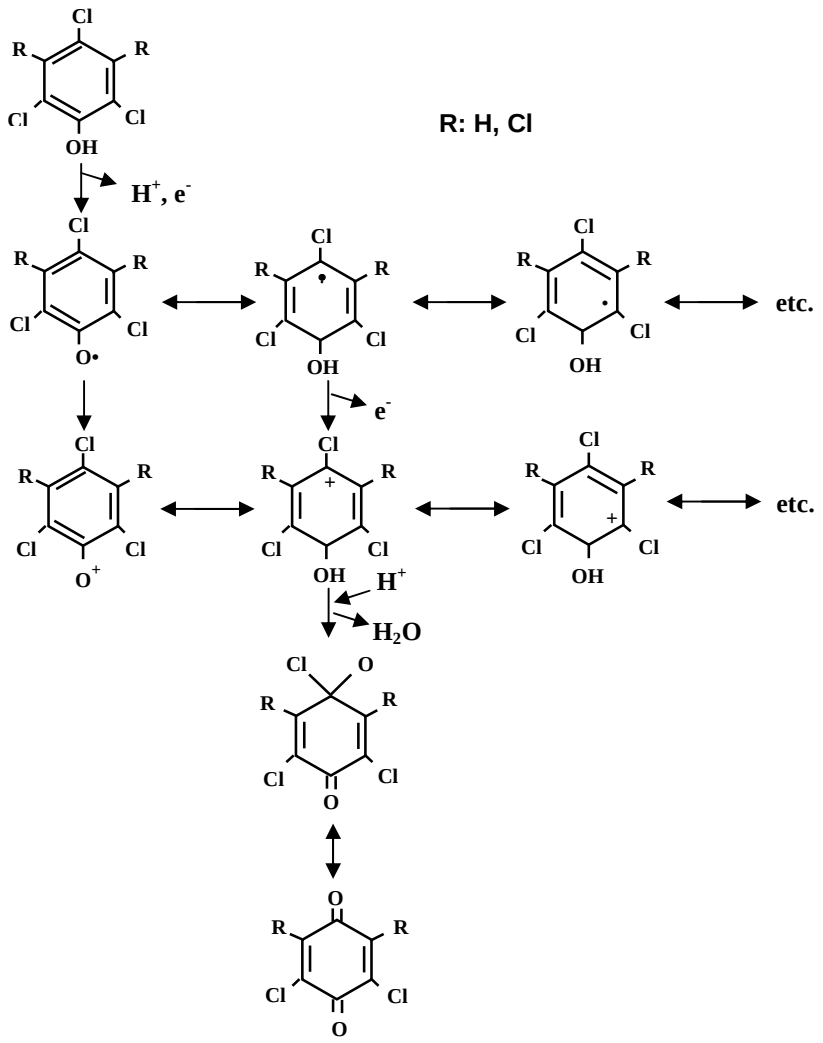

Figura 2.4. Esquema hipotético para la oxidación de 2,4,6-triclorofenol (R=H) y PCF (R=Cl) por peroxidasas y lacasa (deJong y Field, 1997)

Durante la degradación de PCF se generan muchos más intermediarios que en el proceso de degradación de tetra-, tri-, di- y mono- clorofenoles, producto de la elevada resistencia del PCF a la biodegradación, la que esta dada por el mayor número de substituciones de átomos de cloro en el anillo aromático (Janik y Wolf, 1992). Por otra parte, otros estudios (Dec y Bollag, 1990, Rodakiewicz-Nowak, 2000) han demostrado que los clorofenoles con substituciones de cloro en la posición *meta*- son menos metabolizables por enzimas fúngicas (y probablemente más tóxico), que en posición *orto*- y *para*-.

Diversas reacciones se realizan por las diferentes enzimas involucradas en la degradación de clorofenoles, tales como, oxidación, hidroxilación, metilación y reducción, generando poli-hidroxibenceno, el que es mineralizado a CO_2 y agua (D'Angelo y Reddy, 2000, Zouari *et al.*, 2002). Reddy y Gold (2000), propusieron una vía de degradación para PCF por *P. chrysosporium* (Figura 2.4 y Tabla 2.2).

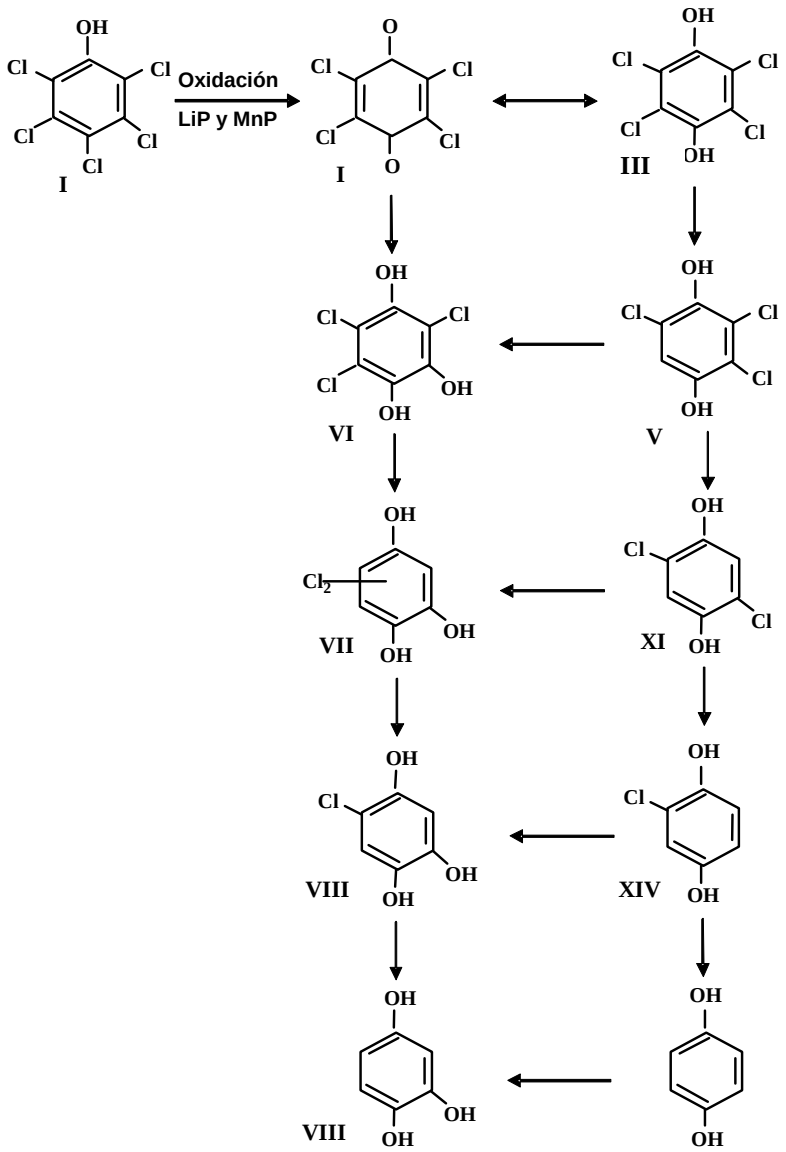

Figura 2.5. Vía propuesta para la degradación de PCF por *P. chrysosporium* (Reddy y Gold, 2000)

Tabla 2.2. Compuestos intermedios de la degradación de PCF por *P. chrysosporium* (Reddy y Gold, 2000)

Simbología	**Compuesto**
I	Pentaclorofenol
II	Tetraclorobenzoquinona
III	Tertaclorodihidroxibenceno
IV	Pentacloroanisol
V	2,3,5-tricloro-1,4-dihidroxibenceno
VI	Tricloro-1,2,4-trihidroxibenceno
VII	Diclorotrihidroxibenceno
VIII	5-cloro-1,2,4-trihidroxibeceno
IX	Tetracloro-1,4-dimetoxibenceno
X	Tetracloro-4-metoxifenol
XI	2,5-dicloro-1,4 dihidroxibenceno
XII	2,3,5-tricloro-4-metoxifenol
XIII	2,2,5-tricloro-1,4-dimethoxibenceno
XIV	2-cloro-1,4-dihidroxibenceno
XV	2,5-dicloro-1,4-dimethoxibenceno
XVI	2,5-dicloro-4-metoxifenol
XVII	2,5-dicloro-1,3,4-trihidroxibenceno
XVIII	1,2,4-trihidroxibenceno

Los múltiples pasos del proceso de degradación de PCF, incluye una dehalogenación oxidativa catalizada por LiP o MnP (con la formación de tetraclorobenzoquinona II) y diversas etapas de dehalogenación reductiva. Este proceso ocurre solamente durante el metabolismo secundario de los hongos y los siguientes procesos de degradación son característicos para el metabolismo fúngico primario y secundario. Como resultado de esto, el tetraclorobenzoquinona es degradado por dos vías paralelas con un intermediario compartido. En la primera vía, este es reducido a tetraclorohidroxibenceno (III), donde se pierden los cuatro átomos de cloro en el transcurso de las

siguientes reducciones, formando 1,4-benzoquinona. Posteriormente, una reacción de hidroxilación genera 1,2,4-trihidroxibenceno (XVIII). En la segunda, se produce la conversión de tetraclorobenzoquinona (enzimática o no enzimática) a tricloro-1,2,4-trihidroxibenceno (VI), compuesto que en reacciones de reducción, pierde los átomos de cloro hasta formar 1,2,4-trihidroxibenceno, el producto aromático final de ambas vías metabólica. Este producto a su vez es metabolizado a dióxido de carbono, desarrollándose la completa mineralización del PCF (Reddy y Gold, 2000).

Respecto a la fracción remanente de PCF que no es mineralizado, diversos autores (Dec y Bollag, 1994, RuttimannJohnson y Lamar, 1997, DiVincenzo y Sparks, 2001), han demostrado que en el suelo esto se atribuye a la adsorción y/o polimerización del PCF a la fracción orgánica e inorgánica del suelo, lo que impide la completa mineralización del contaminante, incluso cuando el PCF es dehalogenado.

O. Rubilar, M.C. Diez, L. Gianfreda. (2007). Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi: A Review. Enzyme and Microbial Technology. BEST 241220. In press.

CAPÍTULO 3

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA, AISLADOS DE BOSQUES DE LA REGIÓN DE LA ARAUCANÍA Y SU POTENCIAL PARA LA REMOCIÓN DE PENTACLOROFENOL

RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca se caracterizan por poseer un sistema enzimático ligninolítico extracelular capaz de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos persistentes. En base a esto, se utilizaron 9 hongos de pudrición blanca provenientes de bosques de la región de La Araucanía, los que fueron evaluados y seleccionados en relación a su potencial para remover PCF en medio líquido. Se realizaron ensayos para seleccionar cepas fúngicas en base a su potencial ligninolítico, mediante pruebas enzimáticas en medio sólido con Poly R-478 y ABTS. Posteriormente, las cepas seleccionadas fueron evaluadas en relación al efecto de la fuente de carbono (glucosa y celulosa, ambas fuentes de concentración 10g/L) y la concentración de nitrógeno (tartrato de amonio 0,2 y 1,2 g/L) en la producción de enzimas ligninolíticas (MnP, LiP, lacasa y VP) y se evaluó indirectamente el efecto de diferentes concentraciones de PCF (0, 10, 20, 40 y 50 mg/L) sobre la capacidad de los hongos para degradar Poly R-478. Finalmente, la cepa con mayor capacidad degradativa fue evaluada para remover PCF, mediante una etapa de acondicionamiento a una concentración de 50 mg/L, la que en una segunda etapa fue incrementada a 100 mg/L, evaluándose también en el proceso de remoción el efecto de aireación intermitente. Se utilizó *Phanerochaete chrysoporium* como cepa control para efectos comparativos.

De las cepas utilizadas *Anthracophyllum discolor*, *Inonotus* sp. y *Stereum hirsutum*, fueron las que presentaron mayor potencial ligninolítico. El medio de mayor producción enzimática fue el constituido con glucosa y la menor concentración de nitrógeno, siendo *A. discolor* la cepa con mayor actividad ligninolítica. En cuanto a la degradación de Poly R-478 con PCF, *A. discolor* fue el hongo que mostró mayor capacidad degradativa, siendo afectada su capacidad por una concentración de 50 mg/L.

La remoción de PCF fue realizada con *A. discolor* y fue mayor a 90 mg PCF/L en total en las dos etapas de adición de PCF, donde la aireación intermitente solamente provocó un metabolismo

más rápido en el hongo. En este proceso, la actividad enzimática ligninolítica fue afectada por adición de PCF, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos enzimáticos y/o físico-químicos que participan en el proceso de remoción.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos de pudrición blanca son organismos reconocidos por su capacidad para metabolizar una gran diversidad de compuestos orgánicos, incluyendo el PCF. *Phanerochaete chrysosporium* (Reddy y Gold, 2000, Zouari *et al.*, 2002) y *Trametes versicolor* (Alleman *et al.*, 1992, Sedarati *et al.*, 2003) han sido los hongos más estudiados en la degradación de PCF, por ser cepas de comportamiento reproducible, rápido crecimiento y altamente eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. Sin embargo, actualmente diversos estudios (Sato *et al.*, 2002, Levin *et al.*, 2004, Walter *et al.*, 2004) han sido orientados a encontrar y evaluar nuevas cepas fúngicas provenientes de diferentes lugares, con el objetivo de ser aplicadas directamente *in situ*, en procesos de depuración de aguas y biorremediación de suelos contaminados, donde las condiciones ambientales, no sería un factor influyente en el crecimiento ni en la activación enzimática de estos hongos. Además, estas nuevas cepas podrían demostrar un mayor potencial en procesos de degradación de compuestos orgánicos persistentes.

El uso de estos hongos en la biorremediación de aguas y suelos contaminados requiere la determinación de las condiciones más adecuada para su crecimiento y activación del sistema ligninolítico en un medio que no corresponde con su hábitat natural. Por ejemplo, una de estas condiciones esta relacionada con el nivel de nitrógeno del medio de cultivo. Leatham y Kirk (1983), observaron que un bajo nivel de nitrógeno estimula el crecimiento de los hongos de pudrición blanca, lo que concuerda con el bajo nivel de nitrógeno que posee la madera. Así mismo, la aireación en el medio de cultivo estimula el sistema ligninolítico y por tanto aumenta la capacidad degradativa de los hongos de pudrición blanca (Rothschild *et al.*, 1999).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el potencial ligninolítico y el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la actividad enzimática ligninolítica de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía. Seleccionar y evaluar un hongo de pudrición blanca como potencial inóculo para degradar PCF y determinar el rol de las enzimas ligninolíticas sobre el proceso degradativo.

3. 2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Compuestos químicos

Se utilizó pentaclorofenol Aldrich, 98% de pureza, el que se preparó a una disolución concentrada de 2000 mg/L en NaOH 0,5 N. Se colocó en un frasco ambar protegido de la luz y se mantuvo a una temperatura de 4ºC. A partir de la disolución concentrada se adicionó a los medios de cultivo líquidos según los requerimientos de concentración de PCF de cada experimento.

3.2.2 Microorganismos y medios de cultivo

Hongos de pudrición blanca

Se utilizaron 9 cepas fúngicas, aisladas de bosques de la región de La Araucanía de Chile. Además, se utilizó el hongo de colección *Phanerochaete chrysosporium* CECT-2798, como cepa control para efectos comparativos. Todas las cepas se conservaron en tubos inclinados a 4ºC con el medio descrito en la Tabla 3.1, esterilizado en autoclave por 20 minutos a 121ºC.

Tabla 3.1. Medio de cultivo para la conservación de hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1 L)			
Agar	15 g	KH_2PO_4	1,0 g
Glucosa	20 g	$MgSO_4$ x $5H_2O$	0,5 g
Peptona	5,0 g	pH	5,5
Extracto de levadura	2,0 g		

Cultivo de mantenimiento

A partir de los tubos de conservación, se tomó una parte del micelio y se colocó en el centro de una placa de Petri, con el medio descrito en la Tabla 3.2 (esterilizado en autoclave por 20 min a 121ºC), la que fue incubada a 25ºC durante 7 días y luego se mantuvieron a 4ºC por no más de 7 días para ser usadas.

Tabla 3.2. Medio de mantenimiento agar extracto de malta (AEM) para hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Agar	15 g	Extracto de malta	3,5 g
Glucosa	15 g	pH	5,5

3.2.3 Ensayos realizados a hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía

Selección de hongos de pudrición blanca con potencial ligninolíticos

Para seleccionar cepas enzimáticamente activas, se realizaron ensayos de decoloración de Poly R-478 y coloración de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6- ácido sulfónico) (ABTS) (Calbiochem).

Se utilizó medio de cultivo con ABTS para determinar cualitativamente enzimas oxidasas (lacasa) en las cepas fúngicas (Bourbonnais y Paice, 1988, Hofrichter y Fritsche, 1996), descrito en la Tabla 3.3 y con Poly R-478 para determinar enzimas peroxidasas (MnP y LiP) (Levin *et al.*, 2004), descrito en la Tabla 3.4. Los ensayos fueron realizados en placas de Petri, las que fueron inoculadas con un trozo de agar de 6 mm proveniente de las placas con los hongos en cultivo de mantenimiento. Las placas fueron incubadas a 25ºC en oscuridad y se evaluó periódicamente el halo de coloración verde del ABTS y la decoloración de violeta a amarillo del Poly R-478 en agar, por un periodo de 14 días.

Tabla 3.3. Medio para la determinación de oxidasas (lacasa) de hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Glucosa	10 g	Tartrato de amonio	0,2 g
KH_2PO_4	2,0 g	ABTS	0,2 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,5 g	Agar	22 g
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,1 g	pH	5,5

Tabla 3.4. Medio para la determinación de peroxidasas (MnP y LiP) de hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Agar	15 g	Extracto de malta	3,5 g
Glucosa	15 g	pH	5,5
Poly R-478	0,2 g		

Efecto de la fuente de carbono y concentración de nitrógeno sobre la producción enzimática ligninolítica de las cepas nativas.

Las cepas fúngicas con mayor potencial ligninolítico seleccionadas del ensayo anterior y *P. chrysosporium*, se llevaron a medio de cultivo líquido para determinar cuantitativamente la producción enzimática (MnP, LiP, lacasa y VP). Se utilizó como base el medio de cultivo Kirk modificado, descrito en la Tabla 3.5 (Tien y Kirk, 1988). Para evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno, se evaluó como primer ensayo la producción enzimática en el medio Kirk, compuesto por glucosa como fuente de carbono y una concentración de nitrógeno de 0,2 g/L de tartrato de amonio (N_1) y luego se evaluó el efecto de una concentración de 1,2 g/L de tartrato de amonio (N_2). Posteriormente, se evaluó el efecto de la fuente de carbono, en el cual se reemplazó la glucosa por 10 g/L de carboximetilcelulosa y también se evaluó el efecto de dos concentración de nitrógeno en el medio (N_1 y N_2).

El inóculo se preparó a partir de los cultivos de mantenimiento, transfiriéndose 6 trozos de agar de 6 mm de diámetro a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio de cultivo. Todos los medios de cultivos fueron incubados durante 15 días en un agitador orbital a 125 rpm y a 25ºC en oscuridad.

En cada uno de los medios, se determinó periódicamente la actividad lacasa, manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), versátil peroxidasa (PV) y consumo de glucosa, durante un periodo de 15 días.

Tabla 3.5. Medio de cultivo Kirk modificado para hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Glucosa	10 g	$CaCl_2$	0,1 g
Tartrato de amonio	0,2 g	Acetato de sodio	3,3 g
KH_2PO_4	2,0 g	Elementos trazas	10 mL
$MgSO_4$ x $5H_2O$	0,5 g	Tween 80 (al 10%)	5,0 mL
pH	4,5		
Elementos traza (Cantidad para 1 L)			
$MgSO_4$	3,0 g	$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4$	0,5 g	$CuSO_4$	0,1 g
NaCl	1,0 g	H_3BO_4	0,01 g
$FeSO_4$ x $7H_2O$	0,1 g	Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,01 g
$CoCl_2$	0,1 g	$AlK(SO_4)_2$ x $12H_2O$	0,01 g

Efecto de la concentración de PCF en la velocidad de decoloración del colorante Poly R-478

Se evaluó el efecto de la concentración de PCF en la decoloración del colorante Poly R-478 a poliantraquinona por acción fúngica, de acuerdo a la metodología descrita por Valentín *et al.* (2006), con algunas modificaciones. Las cepas utilizadas en este experimento fueron las que presentaron un mayor potencial ligninolítico, las mismas que fueron usadas en el ensayo anterior. Se utilizó el medio de cultivo líquido con fuente de carbono y concentración de nitrógeno en el cual las cepas fúngicas presentaron una mayor producción enzimática ligninolítica.

Los ensayos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 40 mL de medio de cultivo. Los matraces fueron inoculados con 2 discos de agar (6 mm cada uno) e incubados durante 5 días en un agitador orbital a 125 rpm y a 25ºC en oscuridad. Posteriormente, a los medios de cultivos se les adicionó 0,2 g/L de Poly R-478 y 0, 10, 20, 40 ó 50 mg/L de PCF.

La velocidad de decoloración fue determinada como un porcentaje de reducción de la razón de la absorbancia a 520 y 350 nm en comparación con el colorante en el control abiótico (sin hongo) (Valentin *et al.*, 2006). Para la determinación de la absorbancia, se tomó 0,2 mL de la muestra centrifugada (10.000 rpm por 10 min), la que fue diluida con 0,8 mL de agua destilada y medida

espectrofotométricamente en una cubeta de 1 mL.

Remoción de PCF por hongos de pudrición blanca

El estudio cinético de remoción de PCF fue realizado con la cepa que presentó una mayor decoloración de Poly R-478 con PCF y *Phanerochaete chrysosporium* CECT-2798, utilizada como cepa control.

Se utilizó el mismo medio de cultivo del experimento anterior, el que se inoculó con 6 discos de agar de 6 mm en un matraz de 500 mL con 150 mL de medio de cultivo y se mantuvo por 5 días en un agitador orbital a 125 rpm y a 25ºC en oscuridad. Posteriormente, al medio se adicionó PCF en dos etapas. En la primera etapa se adicionó PCF al medio para obtener una concentración de aproximadamente 50 mg/L. Posteriormente, una vez que se obtuvo una remoción superior al 90% del contaminante, se agregó nuevamente PCF hasta obtener una concentración aproximada de 100 mg/L. Los ensayos fueron realizado sin aireación y con aireación intermitente (1,5 L/h de aire estéril por 2 minuto diario). Se realizaron controles abióticos para cada uno de los ensayos realizados.

Durante seis semanas se analizó: la remoción de PCF del medio; la adsorción del compuesto en el micelio, la actividad enzimática ligninolítica (MnP, LiP, lacasa y VP), el consumo de glucosa y el nivel proteasas.

3.2.3 Metodología analítica

Determinación de actividad ligninolítica

La actividad enzimática de las enzimas MnP, LiP, VP y lacasa fue determinada a 30ºC en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC. La muestra extraída de los medios de cultivo fue previamente centrifugada por 10 min a 5.000 rpm en una centrifuga refrigerada Ependorff 5408-R. La unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de sustrato por minuto.

Actividad MnP, lacasa y VP: Fueron determinadas a partir de la oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) para producir el dímero llamado cerilignona. Esta reacción se determinó a 468 nm. La actividad lacasa fue realizada en la mezcla de reacción que contiene 200

μL de malonato de sodio (250 mM, pH 4,5), 50 μL de 2,6-DMP (20 mM) y 600 μL de muestra. La actividad MnP se determinó a partir de la misma mezcla de reacción, a la que se adicionó 50 μL de Mn^{2+} (20 mM), fue iniciada por la adición de 100 μL de H_2O_2 (4 mM) y corregida por la actividad lacasa.

La actividad VP fue determinada en la mezcla de reacción conteniendo 200 μL de malonato de sodio (250 mM, pH 4,5), 50 μL de 2,6-DMP (20 mM), 1 mM de EDTA y 550 μL de muestra, en un volumen total de 1 mL. La reacción fue iniciada con 100 μL de H_2O_2 (4 mM) y corregida por la actividad lacasa.

La actividad MnP es expresada como combinación de la actividad MnP-VP menos la actividad VP. El coeficiente de extinción molar fue de 49.000 $M^{-1}cm^{-1}$ (Wariishi *et al.*, 1992, deJong *et al.*, 1994).

Actividad LiP: Se midió mediante la oxidación de alcohol veratrílico a aldehído veratrílico a 310 nm. La mezcla de reacción contiene 200 μL de tartrato de sodio (250 mM, pH 3,0), 200 μL de alcohol veratrílico (10 mM) y 500 μL de muestra. La reacción se inicia con la adición de 100 μL de H_2O_2 (4 mM). El coeficiente de extinción molar fue de 9.600 $M^{-1}cm^{-1}$ (Tien y Kirk, 1988).

Determinación de concentración de glucosa y carboximetilcelulosa

La determinación se basa en la reacción de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluyendo los metil éteres con fenol y ácido sulfúrico concentrado, lo que genera coloración amarilla. La reacción es sensible y estable. Límite máximo de detección es de 0,1 g/L (Dubois *et al.*, 1956).

Procedimiento: Se agregó a un tubo de ensayo 400 μL de solución de fenol al 5% p/v y 400 μL de muestra previamente filtrada por filtro de 0,45 μm de tamaño de poro. Posteriormente, se agregó 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (se agregó este último reactivo en el centro del tubo para lograr una buena mezcla de la solución). Se mantuvieron los tubos sin mover por un periodo de 10 min y luego se agitó en un vortex hasta homogenizar completamente la muestra. Finalmente, se mantuvieron los tubos en un baño termorregulador a 27ºC por un periodo de 20 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 498 nm. La concentración de glucosa y carboximetilcelulosa en la muestra se obtuvo de la curva de calibración realizada con diferentes

concentraciones de glucosa y carboximetilcelulosa.

Determinación de PCF adsorbido en micelio

Para evaluar el contenido de PCF adsorbido a la biomasa fúngica, se filtró (por 0,45 μm) todo el medio de cultivo una vez finalizado el ensayo de degradación de PCF. Posteriormente, el filtro fue doblado de modo de mantener toda la biomasa en su interior y fue transferido a un sistema de extracción Soxhlet con 100 mL de n-hexano. La extracción de PCF se realizó a 80ºC por 8 horas (Soto-Cordoba *et al.*, 2001).

Peso seco de biomasa

Se tomó todo el medio de cultivo sobrante al final del ensayo, se filtró por papel filtro de tamaño de poro 0,45 μm y se secó a 105ºC hasta peso constante. La concentración de biomasa fue determinada como peso seco de biomasa por litro de medio de cultivo.

Determinación de concentración de proteasas

La actividad proteasa (EC 3.4.24) fue *c*uantificado usando substrato azocaseína sulfanilamida (Rowley y Bull, 1977). La azocaseína es una proteína químicamente modificada, preparada por adición de grupos de sulfanilamida a azocaseína, la que es covalentemente ligada a péptidos. Cuando la azocaseína esta sujeta a la acción proteolítica, los péptidos y aminoácidos son liberados de la cadena, resultando una coloración naranja en la solución. Cuando mayor es la actividad proteasa más intenso es el color en la solución.

El ensayo para la determinación de proteasas esta dada por la siguiente secuencia: 250 μL de muestra de sobrenadante previamente centrifugado a 5.000 rpm por 10 min, se adicionó sobre igual volumen de solución de Azocaseína (Sulfanilamida Azocaseína, Sigma, 2,5 g/L). En paralelo se realizó un blanco de la muestra reemplazando el volumen de solución de Azocaseína por igual volumen de agua destilada. Se preparó además, un ensayo correspondiente al blanco para la determinación del cero en el espectrofotómetro en el cual se reemplaza el volumen de muestra y el volumen de solución de Azocaseína por iguales volúmenes de agua destilada. También se prepararon dos patrones que presentan el 0% y 100% de acción de la enzima. En estos se reemplazó el volumen de muestra por igual volumen de agua de destilada. La incubación

de la reacción tiene lugar por 20 min a 37ºC. Posteriormente, la reacción se detuvo con la adición de 1000 µL de ácido tricloroacético 2 M. El ensayo correspondiente al blanco general y el que representa el 0% también consideraron la adición del mismo volumen de ácido. El ensayo para el 100% reemplaza el volumen de ácido por igual volumen de agua destilada. Finalmente, después de la adición de ácido las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm. La absorbancia de la muestra se leyó a 400 nm.

La actividad de la enzima fue expresada por U/L y esta dada por:

$$U/L=[(A_{muestra} - A_{blco\ muestra})*2,5 - A_{0\%}]/A_{100\%}$$

Cuantificación de PCF por HPLC

Para la determinación de la concentración de pentaclorofenol, la muestra extraída de los medios de cultivos fue previamente filtrada por una membrana de tamaño de poro de 0,2 µm. La concentración de PCF se determinó por cromatografía líquida de alta presición (HPLC) utilizando un equipo con bomba Merck-Hitachi modelo L-7100, acoplado a un inyector de Rheodyne, modelo 7725i con un loop de inyección de 20 uL. La columna utilizada fue de fase reversa Lichrophere 60RP select B (5 um), 250 mm de longitud y 4 mm de diámetro. El flujo del sistema fue mantenido en 1 mL/min y la detección se realizó con un detector de arreglo de diodo Merck-Hitachi modelo L-7455. La detección fue realizada a 215 nm. La fase móvil consistió en una mezcla acetonitrilo-ácido fosfórico acuoso (1%) en mezcla 1:1.

Análisis estadístico

El efecto de diferentes concentraciones sobre la decoloración del colorante Poly R-478 por acción de las especies fúngicas fue evaluado por análisis de varianza (ANOVA). Para ello se aplicó el test de Duncan ($p<0,05\%$). Para los ensayos de remoción de PCF se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad enzimática y la remoción de PCF. La significancia estadística fue del 95% de nivel de confianza.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Selección de hongos de pudrición blanca con potencial ligninolítico

Los hongos de pudrición blanca fueron evaluados en relación a su potencial ligninolítico, frente al colorante Poly R- 478, donde se expresa principalmente la actividad de peroxidasas (de Koker *et al.*, 2000, Levin *et al.*, 2004) por decoloración del agar de violeta a amarillo, y en medio conteniendo ABTS, sustrato que actúa como mediador enzimático y que permite realizar un rápido *screening* de cepas fúngicas productoras de enzimas oxidativas extracelulares (lacasa), mediante una coloración verde del agar (Bourbonnais y Paice, 1988, Hofrichter y Fritsche, 1996).

Se evaluaron nueve cepas (Tabla 3.6). Todas presentaron crecimiento en agar con Poly R-478 y ABTS. Sin embargo, sólo ocho mostraron potencial ligninolítico, frente a una o ambas pruebas enzimáticas utilizadas. Las cepas con mayor respuesta fueron *Anthracophyllum discolor*, *Stereum hirsutum* e *Inonotus* sp. (Tabla 3.6), siendo *A. discolor* el hongo que presentó mayor potencial ligninolítico, demostrando una decoloración del 100% de la placa con Poly R-478 y una coloración entre 50 y 75% aproximadamente del medio con ABTS, a los 14 días de incubación (Figura 3.1).

Tabla 3.6. Decoloración de Poly R-478 y coloración de ABTS, por hongos de pudrición blanca

Cepas	Medio conPoly R- 478 (decoloración)	Medio con ABTS (coloración)
Anthracophyllum discolor	++++	+++
Clitocybe pleurotus	+++	++
Galerina patagonica	++	+++
Ganoderma aplanatum	0	+++
Inonotus sp.	+++	+++
Pholiota espumosa	+	++
Plectania chilensis	0	+++
Schizophyllum commune	0	0
Stereum hirsutum	+++	+++
Phanerochaete chrysosporium	+++	0

Escala de decoloración y coloración medida a los 14 días de cultivo. +: diámetro de la zona decolorada o colorada >1 mm y ≤22 mm, ++: diámetro >22 mm y ≤45 mm, +++: diámetro >45 mm y ≤67 mm, ++++: diámetro >67 mm y ≤90 mm y 0: no presenta efecto

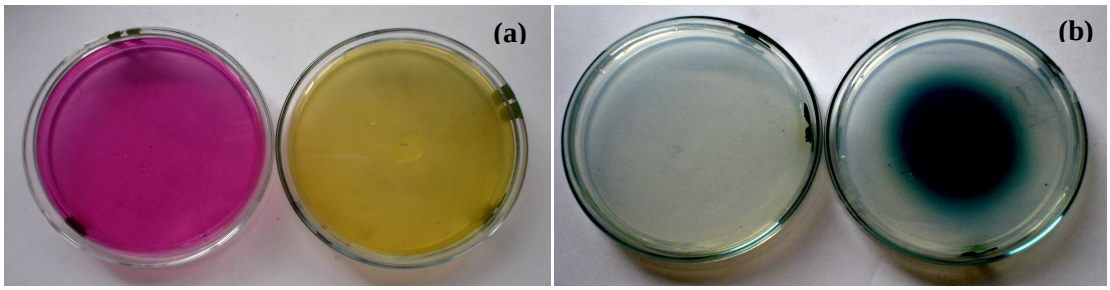

Figura 3.1. *Anthracophyllum discolor*, (a) en medio con Poly R-478, (b) medio con ABTS. (a la izquierda placa control sin inocular, a la derecha placa inoculada con el hongo)

Por otra parte, *P. chrysosporium* especie ampliamente estudiada por su elevada capacidad degradativa frente a compuestos fenólicos clorados (Reddy *et al.*, 1998, Manimekalai y Swaminathan, 2000, Reddy y Gold, 2000, Choi *et al.*, 2002, Zouari *et al.*, 2002), demostró efecto sólo sobre el colorante Poly R-478, lo que concuerda con lo demostrado por Reddy y Gold (2000) y Novotny *et al.* (2004), quienes señalan que este hongo sólo presenta actividad peroxidasa. Sin embargo, Srinivasan *et al.* (1995) y Eichlerová *et al.* (2005) demostraron en *P. chrysosporium*, la presencia de la enzima lacasa, siendo afectada por la fuente de carbono y nitrógeno.

3.3.2 Efecto de la fuente de carbono y concentración de nitrógeno sobre la producción enzimática ligninolítica de las cepas aisladas de bosques de la región de La Araucanía

Con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad ligninolítica, los hongos de pudrición blanca, *A. discolor*, *S. hirsutum* e *Inonotus* sp., previamente seleccionadas de pruebas enzimáticas en placas, fueron evaluadas cuantitativamente en relación a la producción de las enzimas lacasa, MnP, LiP y VP.

En una primera etapa del ensayo, se evaluó la producción enzimática en medio de cultivo líquido con fuente de carbono glucosa (10 g/L) y con dos concentraciones de nitrógeno (N_1: 0,2 g/L y N_2: 1,2 g/L tartrato de amonio), correspondiente a una relación C/N de 12 y 120. En ambos medios de cultivo la actividad ligninolítica de los hongos fue afectada por la concentración de nitrógeno (Tabla 3.7). En el medio con la más baja concentración se observó la mayor actividad, expresada por *A. discolor*, principalmente de MnP y LiP con 146,4 ± 8,1 U/L y 102,2 ± 4,6 U/L,

respectivamente, mientras que en el medio de cultivo con una mayor concentración de nitrógeno la actividad MnP y LiP se redujo en un 48 y 81%, respectivamente (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Máxima actividad enzimática ligninolítica (U/L ± D.S.) de hongos de pudrición blanca en medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono (10 g/L) con 0,2 g/L (N_1) y con 1,2 g/L (N_2) concentración de tartrato de amonio. Números entre paréntesis indican el día de máxima actividad enzimática

Enzima	*Stereum hirsutum*		*Inonotus* sp.		*Anthracophyllum discolor*		*Phanerochaete chrysosporium*	
	N_1	N_2	N_1	N_2	N_1	N_2	N_1	N_2
Lacasa	0,6 ± 0,1 (15)	10,8 ± 1,0 (12)	2,9 ± 0,4 (9)	4,6 ± 0,3 (10)	5,2 ± 0,1 (8)	4,6 ± 0,3 (10)	0	0
MnP	0,8 ± 0,1 (8)	9,1 ± 0,3 (10)	25,2 ± 0,6 (8)	1,2 ± 0,5 (11)	146,4 ± 8,1 (8)	76,0 ± 4,6 (8)	6,0 ± 0,3 (9)	1,3 ± 0,3 (10)
LiP	47,3 ± 3,0 (6)	33,3 ± 1,5 (4)	15,1 ± 3,0 (3)	1,8 ± 1,5 (3)	102,2 ± 4,6 (8)	19,4 ± 3,0 (8)	54,8 ± 4,6 (8)	29,0 ± 4,6 (12)
VP	1,5 ± 0,2 (15)	0,8 ± 0,1 (15)	2,1 ± 0,2 (15)	0,4 ± 0,1 (9)	13,3 ± 1,7 (10)	0,4 ± 0,1 (9)	0,3 ± 0,1 (6)	0,5 ± 0,1 (10)

Para *P. chrysosporium* no se observó actividad lacasa en ambos medios de cultivos y la actividad de las enzimas VP y MnP se expresó en muy bajas concentraciones. No obstante, la enzima LiP presentó una máxima actividad de 54,9 ± 4,6 U/L y 29,0 ± 4,6 U/L en el medio de cultivo con N_1 y N_2, respectivamente (Tabla 3.7). Diversos estudios (Dhawale *et al.*, 1992, Wu *et al.*, 2005), han demostrado que *P. chrysosporium,* bajo condiciones limitantes de nitrógeno produce las enzimas MnP y LiP. Sin embargo, Yu *et al.* (2006) demostraron que *P. chrysosporium* en medio de cultivo líquido con bajo contenido de nitrógeno, expresa solamente actividad MnP, mientras que en medio con alto contenido de nitrógeno, expresa una elevada actividad LiP y baja actividad MnP. En este contexto, diversos estudios (Venkatadri y Irvine, 1990, Lopez *et al.*, 2002), han demostrado que no solamente la fuente de carbono y la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, afecta la producción enzimática ligninolítica, sino que existen otras condiciones, tales como: la agitación, aireación, temperatura, inductores, entre otras, que también afectan la producción enzimática. En esta materia, la temperatura es un importante factor a considerar. Al

respecto, Dosoretz *et al*. (1990), demostraron que en un periodo de 10 días, *P. chrysosporium* es capaz de producir una concentración máxima de 180 U/L de la enzima LiP, bajo las mismas condiciones de cultivo evaluadas en este estudio. Sin embargo, las temperaturas de incubación fue de 37ºC, mientras que en esta investigación la temperatura fue de 25ºC, lo que afectó considerablemente la producción enzimática de esta cepa. La temperatura de 25ºC fue aplicada considerando una temperatura más cercana a la zona donde fueron recolectados los hongos. Además, de tener una mayor factibilidad de aplicación para la biorremediación de suelos.

El efecto de la fuente de carbono sobre la producción enzimática ligninolítica se evaluó en medio de cultivo con carboximetilcelulosa como fuente de carbono (10 g/L), bajo las mismas concentraciones de nitrógeno (N_1 y N_2). En este medio de cultivo la actividad ligninolítica se detectó predominantemente en el medio con el menor contenido de nitrógeno (N_1), la excepción se presentó con *Stereum hirsutum* en la actividad de la enzima LiP (Tabla 3.8). En cuanto a la mayor producción enzimática ligninolítica, fue presentada en el medio de cultivo con *A. discolor*. Sin embargo, los niveles de actividad fueron menores que en el medio con glucosa como fuente de carbono.

Tabla 3.8. Máxima actividad enzimática ligninolítica (U/L ± D.S.) de hongos de pudrición blanca en medio de cultivo con carboximetilcelulosa como fuente de carbono (10 g/L) con 0,2 g/L (N_1) y con 1,2 g/L (N_2) concentración de tartrato de amonio. Números entre paréntesis indican el día de máxima actividad enzimática

Enzima	*Stereum hirsutum*		*Inonotus* sp.		*Anthracophyllum discolor*		*Phanerochaete chrysosporium*	
	N_1	N_2	N_1	N_2	N_1	N_2	N_1	N_2
Lacasa	0,4 ± 0,01 (12)	0,2 ± 0,1 (7)	0,7 ± 0,1 (7)	1,0 ± 0,1 (9)	6,0 ± 0,1 (12)	0,4 ± 0,1 (8)	0	0
MnP	0,5 ± 0,1 (8)	1,7 ± 0,1 (12)	3,7 ± 0,2 (15)	2,0 ± 0,2 (10)	58,9 ± 2,4 (12)	24,0 ± 1,4 (12)	0,5 ± 0,1 (12)	0,2 ± 0,01 (15)
LiP	16,1 ± 1,5 (8)	32,3 ± 3,0 (12)	83,9 ± 9,1 (7)	18,3 ± 1,5 (3)	32,3 ± 3,0 (9)	12,9 ± 0,1 (15)	32,3 ± 3,0 (12)	8,6 ± 0,01 (8)
VP	0,2 ± 0,1 (15)	0,7 ± 0,1 (15)	0,9 ± 0,1 (9)	1,0 ± 0,1 (10)	4,4 ± 0,5 (15)	1,3 ± 0,4 (15)	0,2 ± 0,01 (15)	0,1 ± 0,01 (8)

En la Figura 3.2, se muestra como ejemplo la actividad enzimática ligninolítica de *A. discolor* con ambas fuentes de carbono y con las dos concentraciones de nitrógeno. Se observa una mayor producción enzimática en los medios de cultivo realizadas con glucosa como fuente de carbono, siendo afectadas por la concentración de nitrógeno. Actividades similares fueron obtenidas con todos las cepas fúngicas evaluadas (Ver Anexo Figura A.1,2,3).

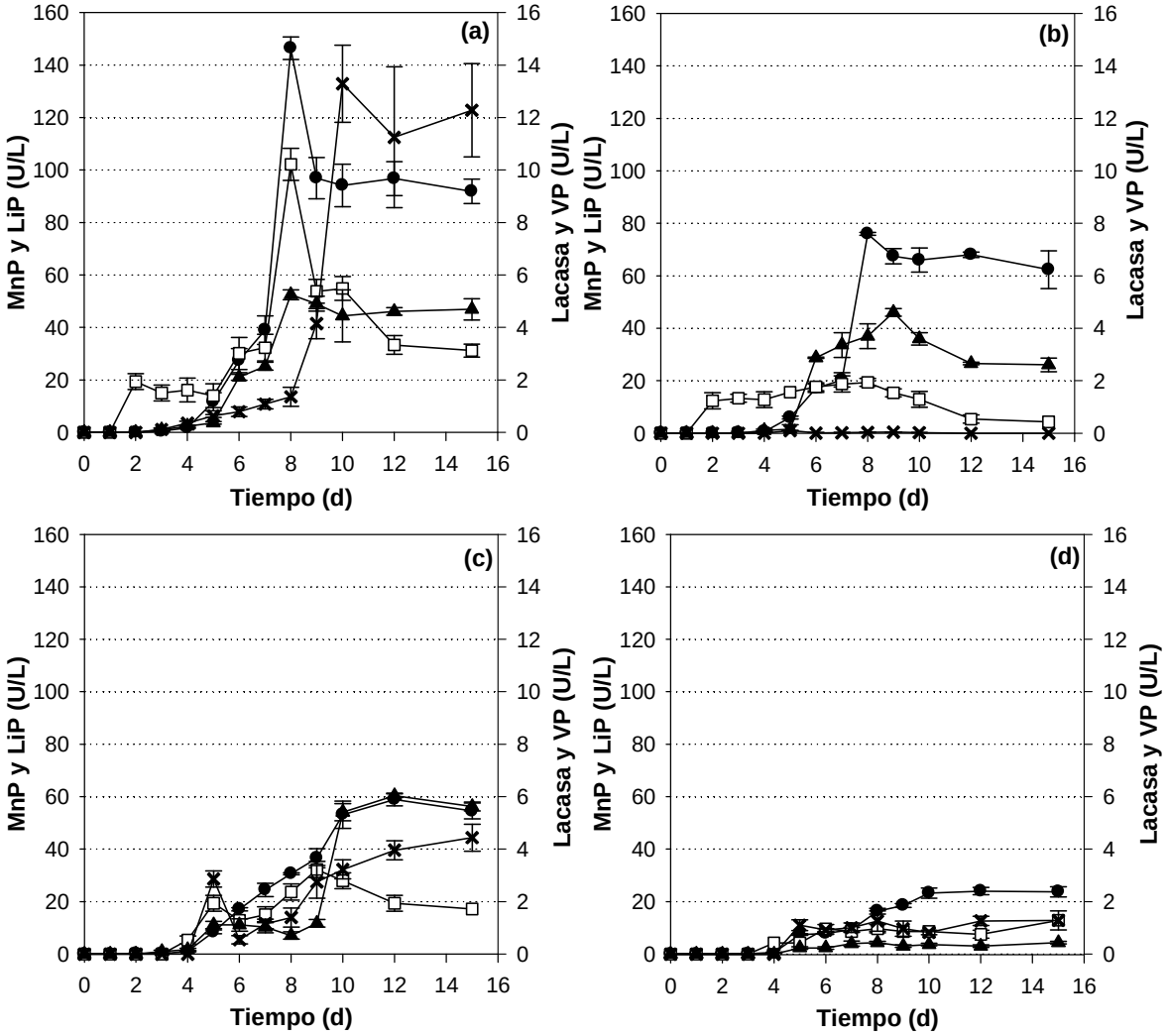

Figura 3.2. Actividad enzimática ligninolítica de *A. discolor* en cultivo con glucosa con N_1 (0,2 g/L de tartrato de amonio) (a) y N_2 (1,2 g/L de tartrato de amonio) (b), y con carboximetilcelulosa con N_1 (c) y N_2 (d). Simbología: ● MnP, □ LiP, ▲ Lacasa y × VP

Los resultados de producción enzimática concuerdan con el consumo de glucosa y carboximetilcelulosa. En el medio de cultivo con *A. discolor*, la máxima actividad enzimática en el medio con glucosa con la menor y mayor concentración de nitrógeno, fue a los 8 y 10 días, respectivamente, correspondiente al completo consumo de glucosa, con una velocidad de consumo de aproximadamente 1,1 g/L d, para ambas condiciones de aireación. Para el medio con carboximetilcelulosa a los 15 días de incubación la concentración fue de aproximadamente 1 g/L (Figura 3.3), siendo consumida más lentamente (0,5 g/L d). Por lo tanto, la máxima actividad enzimática fue expresada más tardíamente, ya que las enzimas son secretadas por estos hongos una vez finalizada la fase de crecimiento o tropofase, es decir, durante el metabolismo secundario (Gianfreda y Bollag, 2002).

Solamente para *Inonotus* sp. en el medio con carboximetilcelulosa provocó un aumento en la actividad LiP, la que incrementó 5,6 veces en el medio con la menor concentración de nitrógeno (N_1) y 10 veces en el medio con la mayor concentración de nitrógeno (N_2), con respecto al medio con glucosa con N_1 y N_2 (Tabla 3.6 y 3.7).

Por otra parte, la producción de enzimas para todas las cepas evaluadas, presentaron un día de máxima actividad, la que disminuyó durante el periodo de incubación. Una técnica utilizada para la mantención de la actividad enzimática en el tiempo, es mediante la aplicación de pulsos de una fuente de carbono (Dozoretz *et al.*, 1990, Valentín *et al.*, 2007).

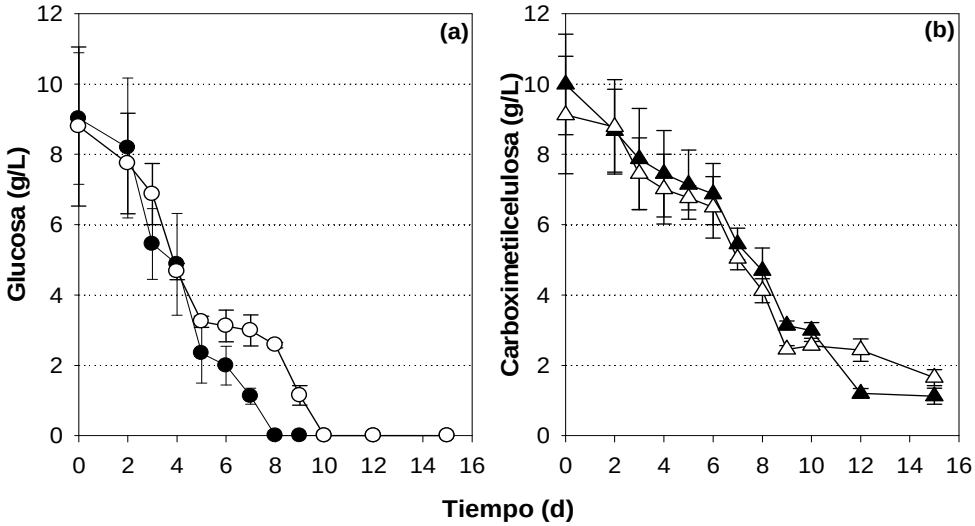

Figura 3.3. Consumo de glucosa (a) y carboximetilcelulosa (b) por *Anthracophyllum discolor* en medio de cultivo con N_1 (●,▲) y N_2 (○,Δ)

Por lo tanto, los resultados mostrados en las Tablas 3.6 y 3.7, sugieren que la producción enzimática ligninolítica de hongos de pudrición blanca depende de las condiciones de cultivo a las que se someten y son diferentes para cada cepa fúngica. Evidentemente, la concentración de nitrógeno afecta la producción enzimática ligninolítica en los hongos evaluados, lo que concuerda con lo observado por diversos estudios realizados con otros hongos (Leatham y Kirk, 1983, Leontievsky *et al.*, 2000, Arora y Gill, 2005). Leontievsky *et al.* (2000), postularon que una cantidad limitante de nitrógeno en el medio de cultivo inicia la actividad enzimática ligninolítica, mientras que un elevado contenido de nitrógeno genera una inhibición completa o parcial del sistema ligninolítico. Leatham y Kirk (1983), demostraron que el efecto regulatorio del nitrógeno en la expresión enzimática ligninolítica es un reflejo del efecto inductivo de los bajos niveles de nitrógeno en la madera. No obstante, este efecto no es una regla general. En *Pleurotus ostreatus* (Kamitsuji *et al.*, 2004) la actividad enzimática fue detectada principalmente con un alta concentración de nitrógeno. Así mismo, Calvo *et al.* (1998) y Buswell *et al.* (1995), reportaron que en medio rico en nitrógeno la producción de lacasa por *Coriolopsis gallica* y *Lentinula edodes* fue estimulada, mientras que en medio con bajo contenido de nitrógeno fue inhibida.

Finalmente, es posible deducir que la producción de enzimas ligninolíticas es una respuesta del hongo a un estrés inducido por las condiciones de cultivo, que puede determinar la concentración de las enzimas en el medio.

3.3.3 Efecto de la concentración de PCF en la velocidad de decoloración del colorante Poly R-478 por hongos de pudrición blanca

Para evaluar la degradación de un contaminante por hongos de pudrición blanca, un prerrequisito necesario es determinar cuál es el nivel tóxico o bien el que puede afectar la capacidad degradativa del hongo en estudio. En este contexto, *S. hirsutum*, *Inonotus* sp., *A. discolor* y *P. chrysosporium* fueron evaluados en relación a la capacidad de decolorar Poly R-478 en presencia de diferentes concentraciones de PCF (0, 10, 20, 40 y 50 mg PCF/L) durante 12 días de incubación.

Los ensayos fueron realizados considerando un crecimiento previo de los hongos de 5 días en el medio, antes de la adición de Poly R-478 y PCF, ya que sin crecimiento previo las cepas no presentaron crecimiento miceliar, ni decoloración del colorante para ninguna de las

concentraciones de PCF evaluadas (0-50 mg PCF/L). Diversos estudios (Mileski *et al.*, 1988, Alleman *et al.*, 1992) han demostrado que la toxicidad de PCF en hongos de pudrición blanca no tiene relación con la concentración del contaminante en medio líquido, sino que esta dada por la dosis química, expresada como la razón entre la masa del químico y la masa de micelio.

La Figura 3.4 muestra la velocidad de decoloración del colorante Poly R-478 para todas las cepas en estudio, bajo diferentes concentraciones de PCF.

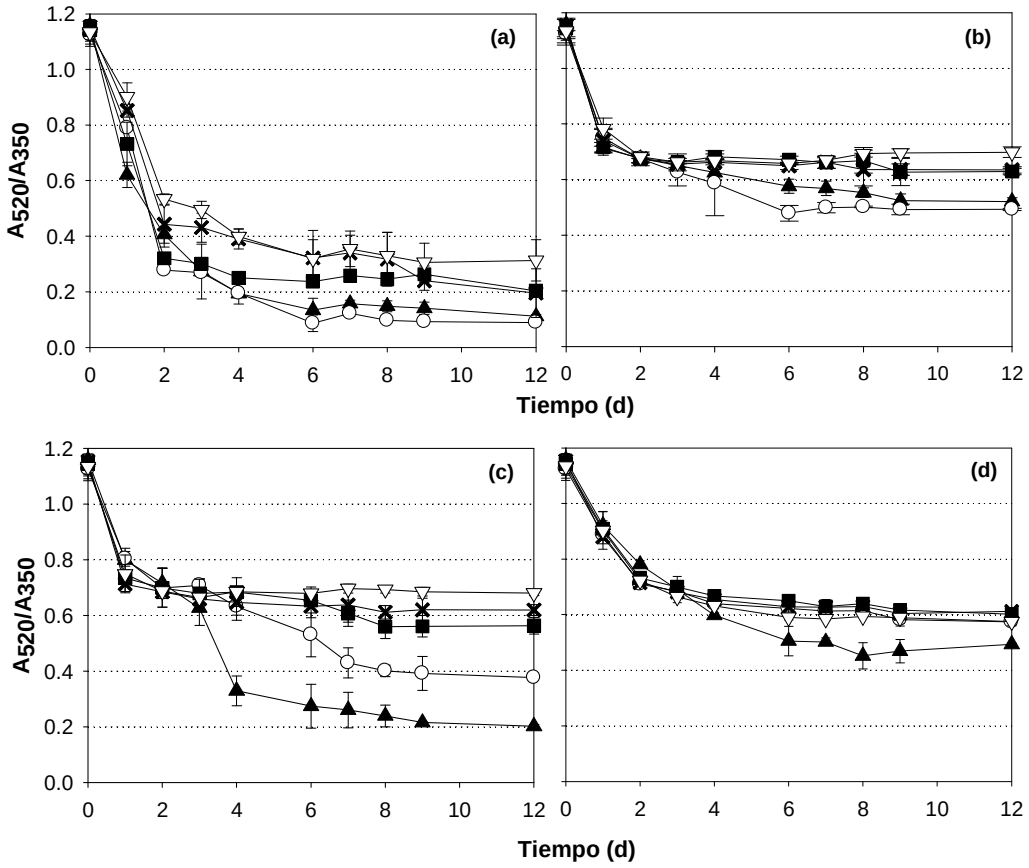

Figura 3.4. Decoloración de Poly R-478 por *Anthracophyllum discolor* (a), *Stereum hirsutum* (b), *Inonotus* sp. (c) y *Phanerochaete chrysosporium* (d), en medio de cultivo con diferentes concentraciones de PCF: 0 mg/L (▲), 10 mg/L (○), 20 mg/L (■), 40 mg/L (×), 50 mg/L (▽)

El análisis estadístico aplicado (test de Duncan, $p<0.05\%$), demostró que la capacidad degradativa de *P. chrysosporium* y principalmente *Inonotus* sp. fue afectada significativamente

por todas las concentraciones de PCF adicionadas, mientras que la capacidad degradativa de *S. hirsutum* fue afectada significativamente por una concentración de PCF mayor a 20 mg/L y *A. discolor* solamente por la concentración de 50 mg/L. En este caso, la decoloración de Poly R-478 por *A. discolor* sin PCF fue de 90% y con la adición de 50 mg PCF/L se redujo a 76%, a los 12 días de incubación, demostrándose el efecto del PCF sobre el hongo.

Estudios realizados por Valentín *et al.* (2006), demostraron que mediante esta medición indirecta de la degradación de un contaminante es posible determinar la concentración a la cual es posible utilizar una cepa fúngica sin provocar efectos tóxicos sobre ella.

La capacidad de decoloración puede ser considerada una medición indirecta de la actividad enzimática (Gold *et al.*, 1988). Couto *et al.* (2004) determinaron una correlación entre la actividad MnP y la decoloración del colorante Poly R-478, indicando que esta enzima es la principal responsable de la degradación de colorantes. Lo que concuerda con la actividad enzimática ligninolítica determinada en el estudio anterior, donde *A. discolor* presentó la mayor actividad MnP y una mayor decoloración de Poly R-478.

3.3.4 Remoción de PCF por hongos de pudrición blanca

En el *screening* de cepas fúngicas provenientes de bosques de la región de La Araucanía con potencial ligninolítico, demostró que *A. discolor* es capaz de decolorar Poly R-478 en presencia de PCF. Por lo tanto, es importante determinar si este efecto está asociado a una degradación detectable de PCF. Para ello, se evaluó la remoción de PCF en medio líquido por *A. discolor* y por *P. chrysosporium*, por medición cuantitativa de PCF residual en el medio de cultivo. Los experimentos fueron realizados sin aireación y con aireación intermitente (1,5 L/h de aire estéril por 2 minuto diario), con el objetivo de determinar el efecto de este parámetro sobre la actividad ligninolítica de los hongos y por tanto en la capacidad degradativa. La contaminación del medio se realizó en dos etapas, una primera etapa con una concentración de 50 mg PCF/L y una segunda etapa con una adición de 100 mg PCF/L aproximadamente, de modo de someter a las cepas a una fase previa de acondicionamiento al contaminante.

El consumo total de glucosa durante la remoción de PCF para *A. discolor* en el medio sin aireación y con aireación intermitente, fue a los 15 y 9 días de incubación, respectivamente, (Figura 3.5). El efecto de aireación en el medio de cultivo permitió un metabolismo más rápido,

lo que se observó como un efecto oxidativo en el micelio, presentándose una coloración café de la biomasa fúngica en el medio con aireación, lo que también posteriormente se produjo en el medio no aireado. Este efecto podría atribuirse a un proceso de envejecimiento más acelerado en las cepas en condiciones aireadas y por tanto un consumo más rápido de la fuente de carbono (Rothschild *et al.*, 1999). Así mismo, el consumo total de glucosa conlleva a la producción de proteasas, como consecuencia de una lisis celular (Dosoretz *et al.*, 1990). En este contexto, la producción de proteasas fue inversamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio y fue estimulada por la aireación intermitente, principalmente para *A. discolor* (Figura 3.5a). Sin embargo, la concentración de proteasas producida por ambas cepas no sobrepasó las 0,35 U/L, lo que es calificado como una baja concentración, considerando que en estudios realizados por Dosoretz *et al.* (1990) con *P. chrysosporium* una concentración alrededor de 8 U/L, puede afectar la producción de enzimas ligninolíticas.

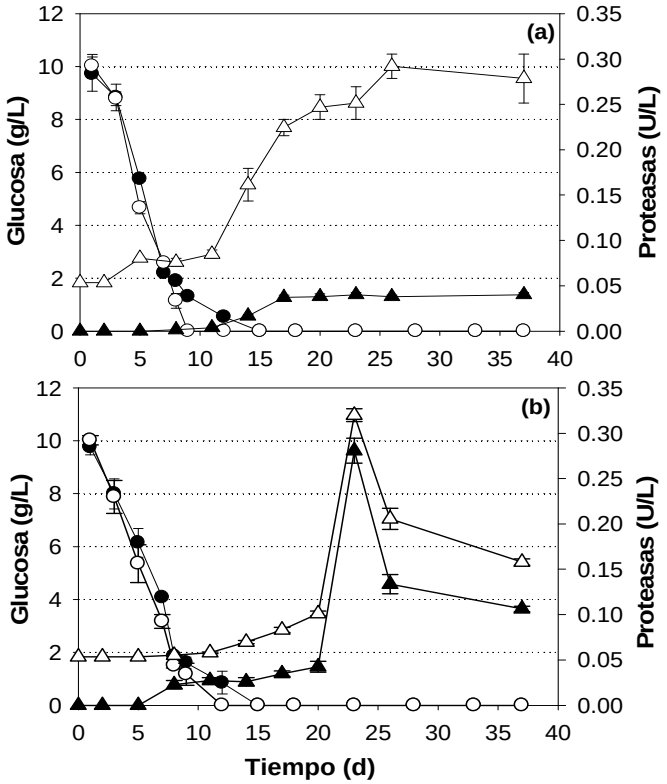

Figura 3.5. Consumo de glucosa (●) y producción de proteasas (▲) por *Anthracophyllum discolor* (a) y *Phanerochaete chrysosporium* (b). Símbolos cerrados representan medio sin aireación y los símbolos abiertos en medio con aireación intermitente (1,5 L/h de aire estéril por 2 minuto diario)

En la Figura 3.6, se presenta la remoción de PCF por *A. discolor* y *P. chrysosporium* en medio sin aireación y con aireación intermitente. En la primera etapa con una concentración aproximada de 50 mg PCF/L, la remoción por *A. discolor* en medio sin y con aireación fue de 88,6 y 98,7% (50,0 y 53,0 mg PCF/L), respectivamente, mientras que en la segunda etapa con 100 mg PCF/L la remoción fue de 41,7% y 49,5% (49,6 y 50,9 mg PCF/L) en medio sin y con aireación, respectivamente (Figura 3.6a). En relación, a la remoción obtenida con *P. chrysosporium*, fue menor a la obtenida con *A. discolor*, en la primera etapa se detectó una remoción de 68,0 y 90,0% y en la segunda etapa la remoción disminuyó considerablemente a 14,6 y 26,0%, en medio sin y con aireación para ambas etapas, respectivamente (Figura 3.6b).

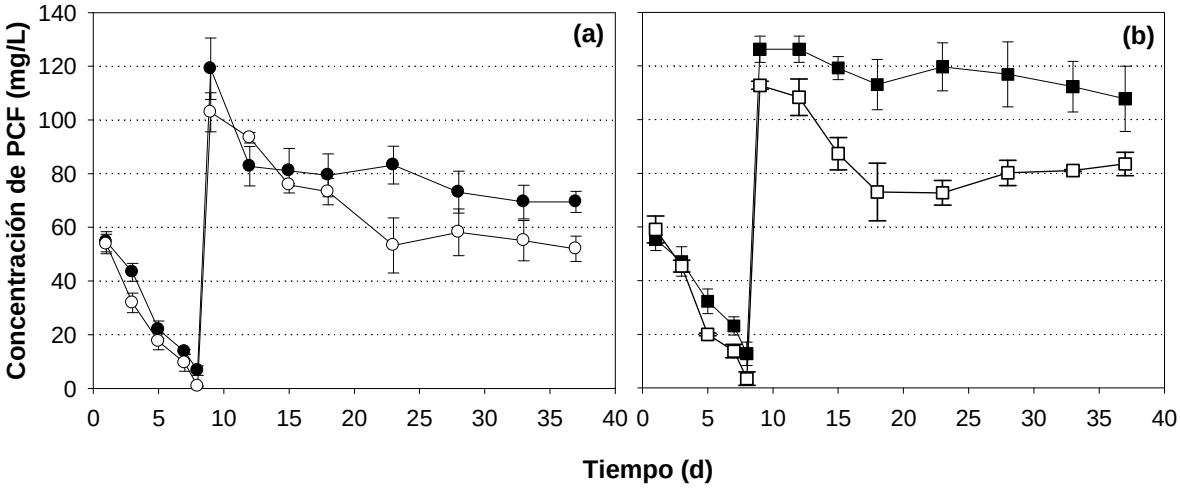

Figura 3.6. Concentración de PCF residual en medio de cultivo con *Anthracophyllum discolor* (a) y *Phanerochaete chrysosporium* (b). Sin aireación (●,■) y con aireación intermitente (1,5 L/h de aire estéril por 2 minuto diario) (○,□)

En la Tabla 3.9 se presenta la concentración adicionada, residual y removida de PCF en medio líquido por *A. discolor* y *P. chrysosporium*, en medio sin y con aireación intermitente, después de 37 días de incubación. Los resultados obtenidos muestran que *A. discolor* posee mayor capacidad de transformar el PCF que *P. chrysosporium*, bajo las condiciones de cultivo evaluadas, con una remoción de 92,5 y 95,4 mg PCF/L (38,8 y 57,0%), en medio sin y con aireación, respectivamente. Estudios realizados por Mileski *et al.* (1988), demostraron que *P. chrysosporium*

en estudios de degradación de PCF a una concentración inicial 100 mg/L, remueve un 22,4 % (22,4 mg PCF/L), después de 24 días de cultivo, mientras que a una concentración de 500 mg/L, es capaz de remover 7,1% (35,5 mg PCF/L). Así mismo, Walter *et al.* (2004) demostraron que de una concentración inicial de 100 mg/L, *P. chrysosporium* remueve hasta 90,3% de PCF (90,3 mg PCF/L) y diferentes cepas de *Trametes versicolor* remueven entre 26,2 y 68,5 % (26,2 y 68,5 mg PCF/L). Por lo tanto, en relación a los resultados obtenidos *A. discolor* puede ser considerada una cepa con elevada capacidad degradativa.

Por otra parte, de la concentración residual de PCF, un 3,3 y 5,4% corresponde a la adsorbida en el micelio de *A. discolor* y un 5,5 y 7,5% en el micelio de *P. chrysosporium*, ambos en medio sin y con aireación, respectivamente (Tabla 3.9). En esta materia, resultados similares fueron obtenidos por Walter *et al.* (2004), que determinaron una adsorción entre 3,3 y 6,6% de una concentración inicial de 100 mg/L de PCF, en medios sin aireación por diferentes cepas de *T. versicolor* y *P. chrysosporium.*

Tabla 3.9. Concentración total de PCF adicionado, residual y degradado por *A. discolor* y *P. chrysosporium*, bajo condiciones de cultivo sin aireación y con aireación intermitente

Hongo	PCF adicionado (mg/L)	PCF residual (mg/L)			PCF removido (mg/L)
		Extracelular	En el micelio	Total	
		Sin aireación			
A. discolor	167,5	69,5	5,5	75,0	92,5
P. chrysosporium	167,2	107,7	8,7	116,5	50,8
		Con aireación			
A. discolor	155,9	52,0	8,5	60,4	95,4
P. chrysosporium	168,4	83,5	12,6	96,1	72,4

El contenido de PCF adsorbido en el micelio esta relacionada con la concentración final de biomasa, cuando mayor es la biomasa en el medio, mayor cantidad del contaminante es adsorbido (Wu *et al.*, 2005). Esto concuerda con el crecimiento de las cepas, en el que *P. chrysosporium*

presento una concentración final de biomasa de 0,62 y 0,69 g/L y *A. discolor* una concentración de 0,51 y 0,61 g/L, en el medio no aireado y aireado, respectivamente.

Durante la degradación de PCF, la actividad ligninolítica de ambas cepas fue considerablemente afectada (Figura 3.7). En el cultivo con *A. discolor* la actividad ligninolítica predominante fue de MnP y LiP con máximas actividades de 40,7 y 44,7 U/L, respectivamente, en medio sin aireación (Figura 3.7a), disminuyendo con la adición de PCF hasta valores no detectables a los 15 días de cultivo. En cuanto a la actividad ligninolítica en medio con aireación, inicialmente la concentración de MnP fue de 55,8 U/L y la actividad LiP de 34,0 U/L, esta última aumentó hasta 44,3 U/L a los 5 días de incubación. La aireación es un factor de gran importancia en la producción de enzimas ligninolíticas.

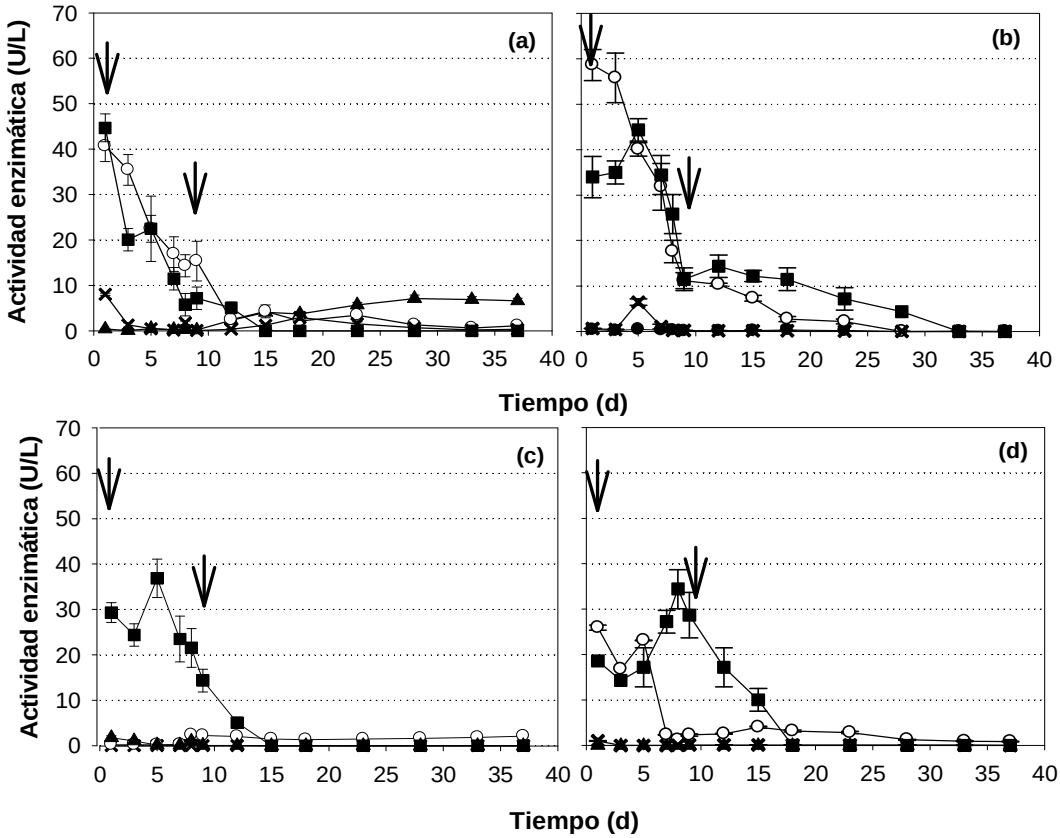

Figura 3.7. Actividad enzimática ligninolítica de *Anthracophyllum discolor* en medio de cultivo líquido contaminado con PCF, sin aireación (a) y con aireación (b) y de *Phanerochaete chrysosporium* en medio contaminado con PCF sin aireación (c) y con aireación (d). Símbolos ▲: lacasa, ○: MnP, ■: LiP y ×: VP. Flechas indican el día de adición de PCF

Li *et al.* (1995), demostraron un aumento de 13 veces en cultivos con *P. chrysosporium*, en comparación a un cultivo sin aireación. No obstante, ambas actividades disminuyeron con la adición de PCF (Figura 3.7b). Así mismo, en el medio con *P. chrysosporium* la actividad predominante fue LiP y fue afectada en ambas condiciones por la adición del contaminante (Figura 3.7c,d). Similares resultados se han obtenido con otros contaminantes sobre la actividad ligninolítica de otros hongos (Dhawale *et al.*, 1992, Leontievsky *et al.*, 2000). Por ejemplo, Leontievsky *et al.* (2000), estudiaron la degradación de 15 mg/L de 2,3,6-triclorofenol en cultivos de *Coriolus versicolor*, en el que la producción de MnP fue completamente inhibida. No obstante, bajo las mismas condiciones, en cultivos con *Panus tigrinus* la actividad MnP es estimulada por la adición de 2,3,6-triclorofenol. Estos resultados confirman que cada hongo posee mecanismos diferentes para transformar un contaminante.

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el método de ANOVA, del cual se obtuvo una correlación de Pearson entre la actividad enzimática ligninolítica y la remoción de PCF. Para ambos hongos y las dos condiciones cultivo no hubo una correlación positiva, de lo cual se demuestra que no hay relación entre ambos parámetros evaluados. En este contexto, se demuestra que en la degradación de PCF por hongos de pudrición blanca, además de las enzimas ligninolítica, las que han sido ampliamente estudiadas y demostrado la degradación de una amplia gama de compuestos orgánicos (Reddy y Gold, 2000, Shrivastava *et al.*, 2005), existen otros sistemas enzimáticos intracelulares (enzima citocromo P-450, quinona reductasa, metiltransferasa) y/o procesos químicos (reacción Fenton) (Reddy *et al.*, 1998, Hammel *et al.*, 2002, Matsuzaki y Wariishi, 2004) que participan en la degradación de contaminantes. Estudios realizados por Reddy *et al.*, (1998) y Reddy y Gold (2000), demostraron que la en la degradación de 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol la enzimas ligninolíticas participan en una primera reacción de oxidación de los contaminantes, la que es seguida por diversar reacciones de otras enzimas, tales como, reducción por acción de la enzima quinona reductasa, metilación por metiltransferasa, oxidación por la enzima dioxigenasa, entre otras.

Por otra parte, Hammel *et al.* (2002) propusieron la hipótesis que los basidiomicetos, además pueden usar especies de oxígeno reactivo (OH, radicales hidroxilos) para degradar compuestos fenólicos, utilizando una ruta de degradación mediante la reacción Fenton ($H_2O_2 + Fe^{3+} + H^+ \rightarrow H_2O + Fe^{2+} + {\cdot}OH$). La ruta para la producción de OH involucra la reducción de Fe^{3+} y O_2 por las enzimas celobiosa dehidrogenasa o hidroquinonas. Esta hipótesis ha sido respaldada por estudios

desarrollados por Oviedo *et al.* (2003) que han detectado reducción de Fe^{3+} por hongos de pudrición blanca.

Por lo tanto, en relación a los resultados obtenidos y a lo contradictorio de lo reportado en literatura, se confirma que las enzimas ligninolíticas están involucradas, pero que además existen otras enzimas y otros mecanismos involucrados en el proceso degradativo.

Por otra parte, no existen reportes que indiquen que *A. discolor* haya sido evaluado para remover PCF. Por lo que este estudio es uno de los primeros que demuestra que puede remover hasta 95 mg PCF/L en medio líquido.

3.4 CONCLUSIONES

De los nueve hongos de pudrición blanca provenientes de bosques de la región de La Araucanía, *Stereum hirsutum, Inonotus* sp. y *Anthracophyllum discolor*, fueron seleccionadas por su alto potencial ligninolítico.

La actividad ligninolítica de las cepas seleccionadas fue afectada por la concentración de nitrógeno y la fuente de carbono, siendo el medio de cultivo con menor concentración de nitrógeno (0,2 g/L tartrato de amonio) y con glucosa (10 g/L de glucosa), el más adecuado para la producción enzimática ligninolítica, principalmente para *A. discolor,* que presentó una mayor actividad MnP y LiP.

La actividad ligninolítica de *Stereum hirsutum, Inonotus* sp. y *P. chrysosporium* fue afectada significativamente por diferentes concentración de PCF en medio líquido. No obstante, en *A. discolor* la actividad ligninolítica sólo fue afectada significativamente por una concentración de 40 mg PCF/L.

En el medio de cultivo líquido con *A. discolor* y PCF, se removió una elevada concentración (> 90 mg PCF/L), siendo mayor que la removida por *P. chrysosporium*, por lo que es considerada una cepa con alta capacidad degradativa.

La aireación intermitente en el medio de cultivo con *A. discolor*, provocó un metabolismo más rápido que en el medio en condiciones no aireadas, demostrado en una mayor concentración de biomasa, un consumo más rápido de glucosa y una mayor actividad enzimática ligninolítica.

La producción de enzimas ligninolíticas de *A. discolor* y *P. chrysosporium* fueron afectadas por la concentración de PCF en el medio y no se encontró una relación directa entre la remoción de PCF y la enzimas, principalmente en la segunda etapa de adición de PCF (100 mg/L), lo que sugiere la participación de otros sistemas enzimáticos o físico-químicos que en conjunto provocan la transformación del PCF.

CAPÍTULO 4

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PCF POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

RESUMEN

El crecimiento y propagación de hongos de pudrición blanca en el suelo, es un importante factor a considerar en procesos de biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes. Se evaluó la biorremediación de suelos contaminados con PCF en un suelo, mediante la utilización de hongos de pudrición blanca, como micelio libre y colonizado en un soporte lignocelulósico. El soporte lignocelulósico fue previamente seleccionado mediante el crecimiento y colonización de *A. discolor* en paja de trigo, granos de trigo y viruta de madera, para posteriormente ser aplicado como inóculo en suelos contaminados. Las cepas utilizadas para la remoción de PCF fueron *A. discolor* y *P. chrysosporium*. Se realizaron ensayos en matraces para evaluar el efecto del soporte lignocelulósico sobre la remoción de dos concentraciones de PCF (250 y 350 mg/kg), el efecto de la microflora autóctona del suelo sobre la capacidad degradativa de los hongos de pudrición blanca y el efecto de las características de dos tipos de suelos (Andisol y Umbrisol) sobre la remoción de PCF por *A. discolor* colonizado en soporte lignocelulósico.

Los granos de trigo utilizados como soporte lignocelulósico permitieron un mayor crecimiento y colonización de *A. discolor*, además de ser utilizado como substrato, promoviendo la actividad de la enzima MnP. Así mismo, la aplicación de hongos de pudrición blanca colonizado en granos de trigo favoreció la propagación del hongo en el suelo y por tanto la remoción de PCF (70-85%), en relación a la utilización del hongo como micelio libre (30-45%), para ambas cepas fúngicas y las dos concentraciones de PCF evaluadas.

La aplicación de granos de trigo en el suelo, permitió la proliferación de microorganismos degradadores de PCF, observándose un efecto sinérgico con *A. discolor* y *P. chrysosporium* incrementando la remoción de PCF en suelos.

El pH del suelo influyó en la adsorción de PCF, siendo más elevada en suelos ácidos. Además, los suelos ácidos reducen la actividad de *A. discolor*, afectando la degradación de PCF.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos de pudrición blanca han recibido una considerable atención durante lo últimos 20 años, debido a su capacidad para degradar una amplia gama de contaminantes ambientales (Aust y Benson, 1993, Pointing, 2001). Sin embargo, la aplicación de estos organismos en el suelo requiere de condiciones ambientales adecuadas, debido a que no es su ambiente natural (Leatham y Kirk, 1983).

Los procesos de biorremediación utilizando hongos dependen de la capacidad de estos microorganismos para colonizar el suelo contaminado. La introducción de hongos de pudrición blanca en el suelo, requiere de un crecimiento óptimo para competir con los microorganismos del suelo, ya que en este ambiente existe una amplia variedad de microorganismos saprófitos, los que pueden inhibir el crecimiento y la actividad ligninolítica de los hongos (Reddy y Mathew, 2001).

Actualmente, se han desarrollados estudios orientados a optimizar la biodegradación de contaminantes en el suelo por hongos de pudrición blanca (Okeke *et al.*, 1997, Meysami y Baheri, 2003, Walter *et al.*, 2004). Algunos estudios consideran la aplicación de material lignocelulósico, el que es utilizado como fuente de carbono y nitrógeno. Los más utilizados son: mazorca de maíz, aserrín, viruta de madera y paja de trigo, los que son colonizados con el hongo y luego aplicados directamente al suelo contaminado (Meysami y Baheri, 2003, Walter *et al.*, 2004).

El crecimiento de los hongos en estos soportes favorecen la producción de enzimas ligninolítica y por tanto la degradación de contaminantes. Moredo *et al.* (2003), reportaron valores de 1000 y 1232 U/L para LiP y MnP, respectivamente, en *P. chrysosporium* pre-cultivado en diferentes materiales lignocelulósico, siendo muy superior a la actividad enzimática en el medio control sin el residuo.

Los parámetros ambientales, tales como pH y características físico químicas del suelo son importantes reguladores de la sobrevivencia y actividad ligninolítica de hongos de pudrición blanca (Okeke *et al.*, 1996). El pH, la característica del suelo y el contaminante, determinarán la biodisponibilidad del contaminante a la acción de los hongos (Cea *et al.*, 2005). Okeke *et al.* (1996), determinaron que bajo condiciones adversas los xenobióticos pueden llegar a ser recalcitrantes.

La investigación realizada tiene por objetivo, seleccionar un material lignocelulósico para ser utilizado como soporte para la colonización e inoculación de hongos de pudrición blanca en el suelo. Evaluar la biorremediación de suelos contaminados con PCF por los hongos de pudrición blanca *A. discolor* y *P. chrysosporium*, utilizando micelio libre y micelio colonizado en un soporte lignocelulósico. Evaluar el efecto de la microflora autóctona del suelo sobre la capacidad degradativa de *A. discolor* y *P. chrysosporium*, y evaluar el efecto del tipo de suelo sobre la remoción de PCF por *A. discolor*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Compuestos químicos

Se preparó una solución de pentaclorofenol (Aldrich, 98% de pureza) de 10.000 mg/L en acetona. Se colocó en un frasco ambar protegido de la luz y se mantuvo a una temperatura de 4ºC. A partir de la disolución concentrada se contaminó el suelo hasta obtener las concentraciones de PCF, en mg/kg de suelo, requerido por cada experimento.

4.2.2 Microorganismos y medios de cultivo

Hongos de pudrición blanca

Se utilizó la cepa *Anthracophyllum discolor* perteneciente a la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de La Frontera, previamente seleccionada por su capacidad para degradar PCF en medio líquido. Además, se utilizó la cepa de colección *Phanerochaete chrysosporium* CECT-2798, la que fue utilizada como control.

Medios y condiciones de cultivo

Las cepas se cultivaron a partir de los tubos de conservación como fue descrita en la sección 3.2.2, se tomó un disco del micelio de 6 mm y se colocó en el centro de una placa de Petri con AEM (sección 3.2.2). La placa fue incubada a 25ºC durante 7 días y luego se mantuvo a 4ºC por no más de 7 días. El inóculo fue preparado a partir del cultivo fúngico en placas, transfiriéndose 4 trozos circulares de agar colonizado (5 mm de diámetro) a un matraz Erlenmeyer de 1 L con 100 mL de medio de cultivo Kirk, previamente descrito en la sección 3.2.2. Los matraces se incubaron a 25ºC durante 6-7 días en condiciones estáticas, hasta la formación de micelio. El cultivo fue posteriormente homogenizado en un blender durante 70 segundos antes de ser utilizado como inóculo.

4.2.3 Suelos utilizados

Se utilizó un suelo Andisol de la serie Temuco, Chile, utilizado para cultivo. Además, se utilizaron dos suelos Umbrisoles, uno de uso forestal y otro de cultivo, ambos provenientes de Santiago de Compostela, España. Los suelos fueron extraídos de una profundidad 0-20 cm, tamizados hasta un tamaño de partícula inferior a 2 mm y almacenados en envase plástico a una temperatura de 4ºC para su uso posterior. La caracterización físico-química de los tres suelos utilizados se presenta en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Caracterización físico-química de los suelos

Parámetro	Suelo Andisol Cultivo	Suelo Umbrisol Cultivo	Suelo Umbrisol Forestal
pH (en agua)	6,10	4,84	4,82
Nitrógeno (%)	0,72	0,30	0,88
Carbono (%)	8,06	5,74	10,13
Fósforo (mg/kg)	23	265	4
Materia orgánica (%)	14	10	18
C/N	11	19	11

4.2.4 Preparación de los materiales lignocelulósicos y los suelos utilizados

Preparación de material lignocelulósico

Se usó paja de trigo picado, granos de trigo y viruta de madera como material lignocelulósico. Se agregó 2 g de cada uno de los materiales a tubos de ensayo. Luego se agregó 2 mL de agua destilada y fueron llevados al autoclave a 121ºC por 40 minutos dos veces consecutivas.

Preparación del suelo

Se agregó 10 g de suelo en matraces Erlenmeyer de 100 mL. El suelo se utilizó en condiciones estériles (controles) y no estériles. Para la esterilización, los matraces con el suelo fueron

autoclavados a 121ºC por 40 minutos dos veces consecutivas. A cada uno de los matraces se adicionó PCF en concentraciones de 250 y 350 mg/kg, según corresponda. Posteriormente, el suelo fue agitado vigorosamente en los matraces y mantenido bajo campana de flujo laminar durante 24 horas para la evaporación del solvente.

4.2.5 Ensayos de biorremediación de suelos contaminados con PCF por la acción de hongos de pudrición blanca

Selección de material lignocelulósico para la colonización de hongos de pudrición blanca

De las placas de Petri con AEM (descrito en sección 3.2.2) inoculadas con *A. discolor* se extrajo un trozo circular de agar colonizado con el hongo (5 mm de diámetro) para ser inoculado en el centro de una placa con AEM. Luego, se agregó el material lignocelulósico (paja de trigo, grano de trigo o viruta de madera) en la placa, alrededor del trozo de agar colonizado con *A. discolor* a una distancia de aproximadamente 4 cm. Las placas fueron incubadas a 25ºC durante 7 días. Se determinó cualitativamente el crecimiento del micelio sobre el material lignocelulósico y se realizó de cada uno de los materiales lignocelulósicos cultivados con el hongo una microscopía electrónica de barrido. Se seleccionó el material que demostró mayor colonización del hongo. Los ensayos fueron realizados en triplicado.

Utilización de material lignocelulósico como substrato para el crecimiento fúngico

Estos ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL con *A. discolor* y *P. chrysosporium*, en triplicado. A cada matraz se adicionó 2 g del material lignocelulósico seleccionada del ensayo anterior y 4 mL de agua estéril. Cada frasco se mezcló con 4 mL de inóculo del hongo homogenizado en un blender (según lo descrito sección 4.2.2) y se incubaron a 25ºC durante 4 semanas en condiciones estáticas. Periódicamente se extrajo muestras del líquido para determinar la actividad de la enzima MnP. Al inicio y al término del periodo de incubación se determinó el peso seco del material lignocelulósico a 105ºC, para evaluar la degradación por acción de los hongos de pudrición blanca.

Remoción de PCF en un suelo Andisol, mediante la utilización de hongos, como micelio libre y colonizado en un soporte lignocelulósico

Los ensayos fueron realizados con suelo Andisol contaminado con 250 y 350 mg/kg. Las cepas utilizadas fueron *A. discolor* y *P. chrysosporium* y la forma de inoculación fue como micelio libre y micelio colonizado sobre granos de trigo. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Ensayos con micelio libre

A cada matraz con el suelo contaminado con PCF, se agregó 4,5 mL de inóculo con el hongo homogenizado (descrito en la sección 4.2.2) y para los suelos esterilizados (control) se agregó 4,5 mL de agua destilada estéril. Este volumen de agua proporcionó una humedad del 35%. Los frascos fueron incubados a 25ºC durante 4 semanas en condiciones estáticas.

Ensayos con micelio colonizado sobre material lignocelulósico

Cada matraz con el suelo contaminado con PCF se humedeció con 4,5 mL de agua estéril. Los ensayos con hongo se realizaron agregando a cada matraz 2 g de granos de trigo previamente colonizado con el hongo durante 7 días, como se describe en la sección 4.2.3. A los suelos esterilizados (controles) se agregó 2 g de granos de trigo, como se describe en la sección 4.2.4. Los frascos fueron incubados a 25ºC durante 4 semanas en condiciones estáticas.

La toma de muestra se realizó con todo el suelo contenido en el matraz (10 g de suelo), por lo cual se tomaron matraces periódicamente para determinar la concentración remanente de PCF y la actividad de la enzima MnP en el suelo.

Se determinó la velocidad de degradación, mediante una linearización aplicando logaritmo a la concentración de PCF removido en relación al tiempo, donde la pendiente indicó la velocidad de degradación expresada en mg/kg d.

Efecto del tipo de suelo sobre la degradación de PCF por el hongo de pudrición blanca Anthracophyllum discolor

Los ensayos se realizaron con suelo Andisol (cultivo) y suelo Umbrisol (forestal y cultivo). Se utilizó la cepa *A. discolor* y la concentración de PCF usada fue de 250 mg/kg de suelo. Se adicionó el hongo colonizado sobre granos de trigo.

La toma de muestra se realizó con todo el suelo contenido en el matraz (10 g de suelo), por lo cual se tomaron matraces periódicamente para determinar la concentración residual de PCF, la actividad de la enzima MnP en el suelo y el pH del suelo al inicio y al final del estudio. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

4.2.6 Metodología analítica

Microscopía electrónica de barrido

Se tomó 2 a 3 trozos de material lignocelulósico de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm con un espesor 0,3 ó 0,5 cm. Se colocaron en una placa de Petri y se dejaron secar por 12 horas a 50ºC hasta que se observe que los fragmentos estén totalmente secos.

Los trozos de material lignocelulósico se sumergieron en glutaraldehído al 2,5% por 15 minutos y se lavaron con buffer fosfato 0,1 M pH 7,0. Posteriormente, las muestras se colocaron en tetraóxido de osmio por dos horas y fueron deshidratadas por medio de inmersiones de cinco minutos en etanol a diferentes concentraciones (70, 80, 90 y 100%). Las muestras fueron depositadas sobre el porta muestras y recubiertas con oro para realizar las observaciones en el microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-6380LV.

Determinación de actividad MnP

La actividad MnP fue determinada mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol, descrita en la sección 3.2.3. Para la extracción de la enzima del suelo, a cada frasco de los ensayos de biodegradación de PCF, se adicionaron 5 mL de una solución de tartrato de sodio 250 mM a pH 4,5. La suspensión de suelo se agitó a 300 rpm durante 20 min en un agitador orbital y después se tomó una alícuota del lixiviado, se centrifugó a 6.000 rpm por 10 min.

Extracción y análisis de PCF en el suelo

La extracción de PCF se realizó utilizando con todo suelo contenido en el matraz (10 g de suelo). Para la transformación (extracción) completa del PCF, se acidificó la muestra hasta pH 2 con una solución de H_2SO_4 0,1 N. Posteriormente se adicionó al medio de cultivo 20 mL de una disolución orgánica de hexano-acetona (1:1, v/v acidificada con H_2SO_4 a pH 2) y se mezclaron las dos fases vigorosamente en un agitador orbital a 300 rpm por 2 horas, con el fin de transportar todo el PCF desde el suelo al solvente orgánico. Posteriormente, las muestras fueron llevadas a un baño con ultrasonidos durante 15 minutos, para remover la emulsión formada y liberar la fase orgánica. Después de separar las fases se tomó una alícuota de la fase orgánica, se concentró en rotavapor cuando fue necesario, se filtró a través de membranas hidrofílica de 0,22 μm de tamaño de poro, para remover partículas de suelo.

El pentaclorofenol residual fue determinado por HPLC según la metodología descrita en la sección 3.2.3.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y diferencias significativas fueron establecidas a través de un test de Duncan ($p<0,05$).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Selección de material lignocelulósico para la colonización de hongos de pudrición blanca

Se realizó una selección del tipo de material lignocelulósico para ser utilizado como soporte en la colonización e inoculación de hongos de pudrición blanca en el suelo. Se evaluó paja de trigo, grano de trigo y viruta de pino, en función de una medición cualitativa del crecimiento de *A. discolor* sobre los materiales lignocelulósicos en placas con AEM.

En la Figura 4.1 se muestra el crecimiento de *A. discolor* en los soportes lignocelulósicos después de 7 días de incubación. Se observó crecimiento en los tres soportes. Sin embargo, como se observa en la Tabla 4.2 en el grano de trigo fue mayor y más rápida la colonización, seguida por la paja de trigo y por último la viruta de madera.

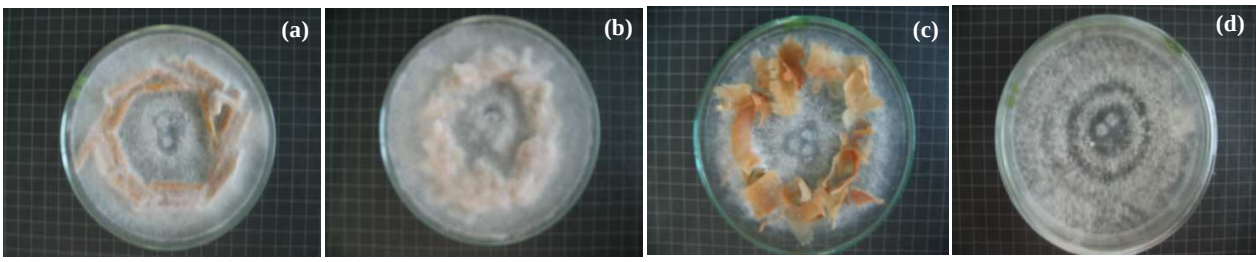

Figura 4.1. Colonización de material lignocelulósico por *Anthracophyllum discolor*. Paja de trigo (a), grano de trigo (b), viruta de pino (c) y control (d)

Tabla 4.2. Crecimiento de *Anthracophyllum discolor* en diferentes soportes lignocelulósicos después de 7 días de incubación

Soporte	Crecimiento
Paja de trigo	++
Grano de trigo	+++
Viruta de madera	+

Escala relativa al crecimiento en el soporte: +++ alta, ++ media, + baja

Para corroborar el crecimiento y colonización de *A. discolor* en los materiales lignocelulósicos, se realizó una microscopía electrónica de barrido de cada uno de los soportes utilizados, como se muestra en la Figura 4.2. El crecimiento y colonización de *A. discolor* fue mayor en granos de trigo, cubriendo completamente el soporte lignocelulósico después de 7 días de incubación, observándose un alto crecimiento miceliar (Figura 4.2b), mientras que en paja de trigo y viruta de madera se observó un débil crecimiento y colonización del hongo en la superficie de ambos soportes lignocelulósicos (Figura 4.2a,c).

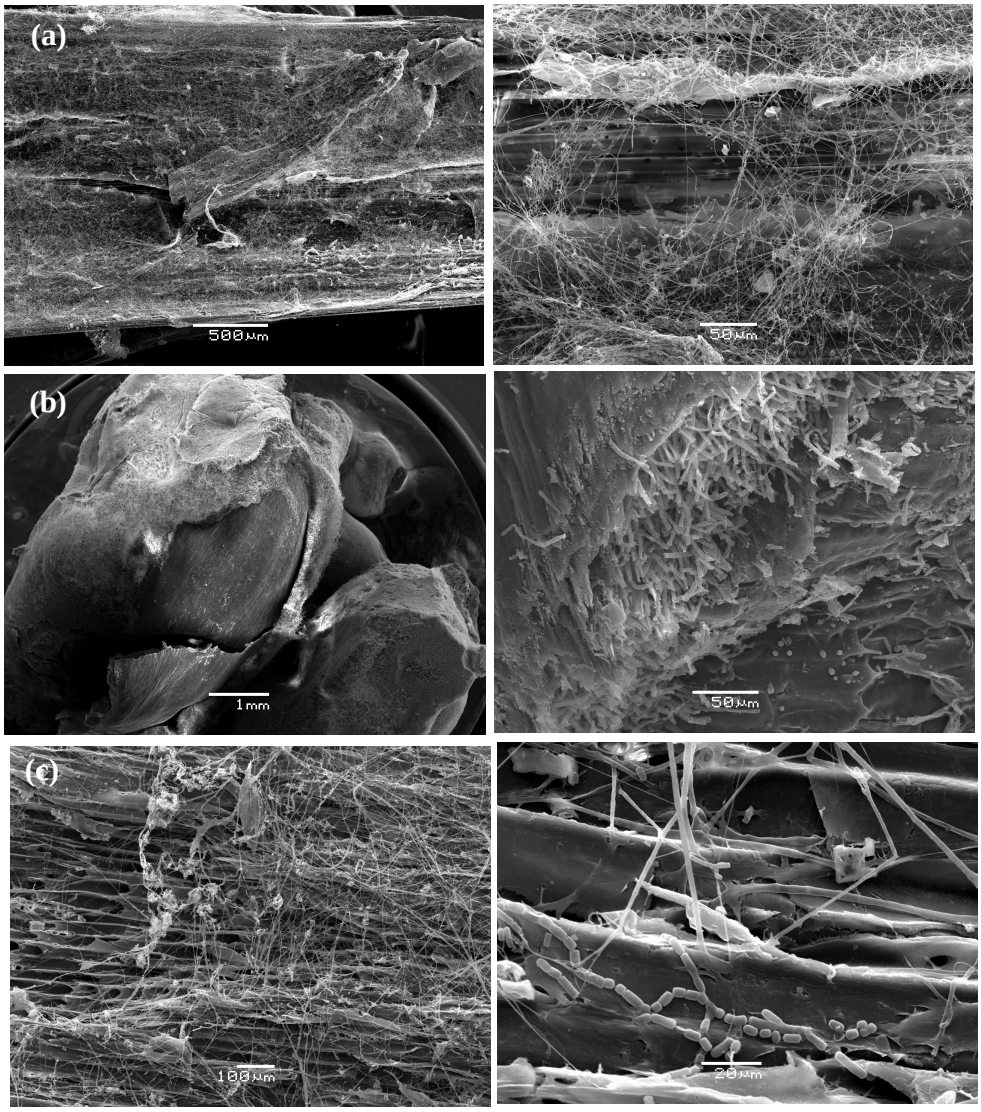

Figura 4.2. Micrografía electrónica de paja de trigo (a), grano de trigo (b) y viruta de madera (c) colonizados con *A. discolor*. Imágenes a la izquierda baja resolución y derecha mayor resolución

El efecto que provocó el grano de trigo en el crecimiento del hongo, se debe probablemente a que posee hidratos de carbono y almidón, lo que no contienen los otros soportes. Esto proporciona una mayor fuente de energía para el hongo, un mayor crecimiento, lo que demuestra que es un material susceptible de ser utilizado como sustrato para hongos de pudrición blanca y ser aplicado en procesos de biorremediación de suelos contaminados.

4.3.2 Utilización de material lignocelulósico como substrato para el crecimiento de *Anthracophyllum discolor* y *Phanerochaete chrysosporium*

Se evaluó la factibilidad de utilizar granos de trigo como substrato para el crecimiento de hongos de pudrición blanca. En la Figura 4.3 se muestra la producción de la enzima MnP para *A. discolor* y *P. chrysosporium* en el medio con granos de trigo. El máximo valor de actividad de la enzima MnP se obtuvo a los 19 días de cultivo, con un valor para *A. discolor* y *P. chrysosporium* de 2,6 y 1,4 U/g trigo, respectivamente. Posteriormente, se observó una pérdida de actividad de 69 y 58% para *A. discolor* y *P. chrysosporium*, respectivamente, a los 28 días de incubación. Efectos similares de pérdida de actividad de la enzima MnP obtuvieron Lechner y Papinutti (2006), con *Lentinula edades* en cultivos con paja de trigo.

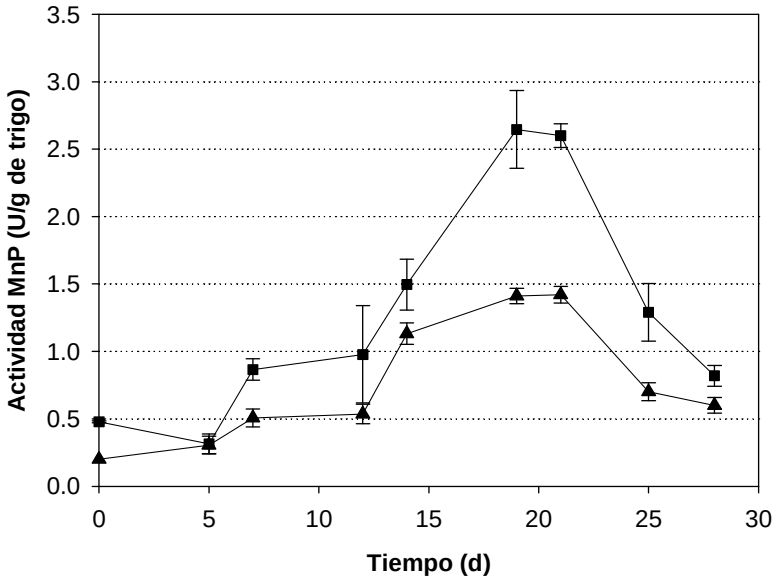

Figura 4.3. Producción de MnP por *Anthracophyllum discolor* (■) y *Phanerochaete chrysosporium* (▲) cultivados en medio con grano de trigo

La degradación del trigo después de 28 días de incubación (medido como pérdida de peso de sólidos totales), fue de 19,9 y 21,4% para *P. chrysosporium* y *A. discolor*, respectivamente. La degradación del trigo en ambas cepas fueron muy similares, mientras que la máxima actividad de la enzima MnP de *A. discolor* fue 1.9 veces mayor a la detectada en cultivos con *P. chrysosporium* (Figura 4.3). Este fenómeno ya ha sido observado en pruebas de bioblanqueo de pasta de papel, donde una mayor actividad ligninolítica alcanzada en algunos cultivos de *Bjerkandera adusta*, no proporciona un mayor potencial de bioblanqueo (Feijoo *et al.*, 1997).

A pesar, de que se han empleado de manera importante diversos materiales lignocelulósicos para permitir la propagación de los hongos y favorecer las condiciones de biorremediación del suelo, hay pocos estudios relacionados con la producción de enzimas ligninolíticas sobre grano de trigo. En este sentido uno de los substratos más utilizados para favorecer el crecimiento de hongos de pudrición blanca en suelos contaminados es la paja de trigo (Dorado *et al.*, 1999, Hofrichter *et al.*, 1999, Lechner y Papinutti, 2006). Cultivos de *P. chrysosporium* sobre este sustrato ha producido una actividad MnP de 2,2 U/g de soporte seco (Xu *et al.*, 2001), mientras que otros hongos como *Nematoloma frowardii* cultivado en el mismo material lignocelulósico produjo hasta 16 U/g de soporte (Hofrichter *et al.*, 1999). Así mismo, Dorado *et al.* (1999), demostraron el uso de paja de trigo como substrato por *Pleurotus eryngii, P. chrysosporium, Phlebia radiata* y *Ceriporiopsis subvermispora*, por una pérdida de peso del material lignocelulósico entre 10 y 25% después de 30 días de incubación.

4.3.3 Remoción de PCF en un suelo Andisol, mediante la utilización de hongos, como micelio libre y colonizado en un soporte lignocelulósico

Se evaluó la remoción de PCF en un suelo Andisol por *A. discolor* y *P. chrysosporium* con dos concentraciones iniciales (250 y 350 mg/kg), utilizando los hongos, en forma libre y colonizados en granos de trigo (soporte lignocelulósico). Se evaluó el efecto de los microorganismos del suelo sobre la remoción de PCF y la adsorción del PCF a la fracción orgánica e inorgánica del suelo.

En la Figura 4.4 se presenta la concentración residual de PCF para todos los tratamientos. Para ambas concentraciones de PCF adicionada, se observó que una alta remoción del contaminante fue obtenida principalmente por los hongos colonizados en granos de trigo. Además, se observó que la mayor remoción de PCF ocurrió durante los primeros 14 días de incubación.

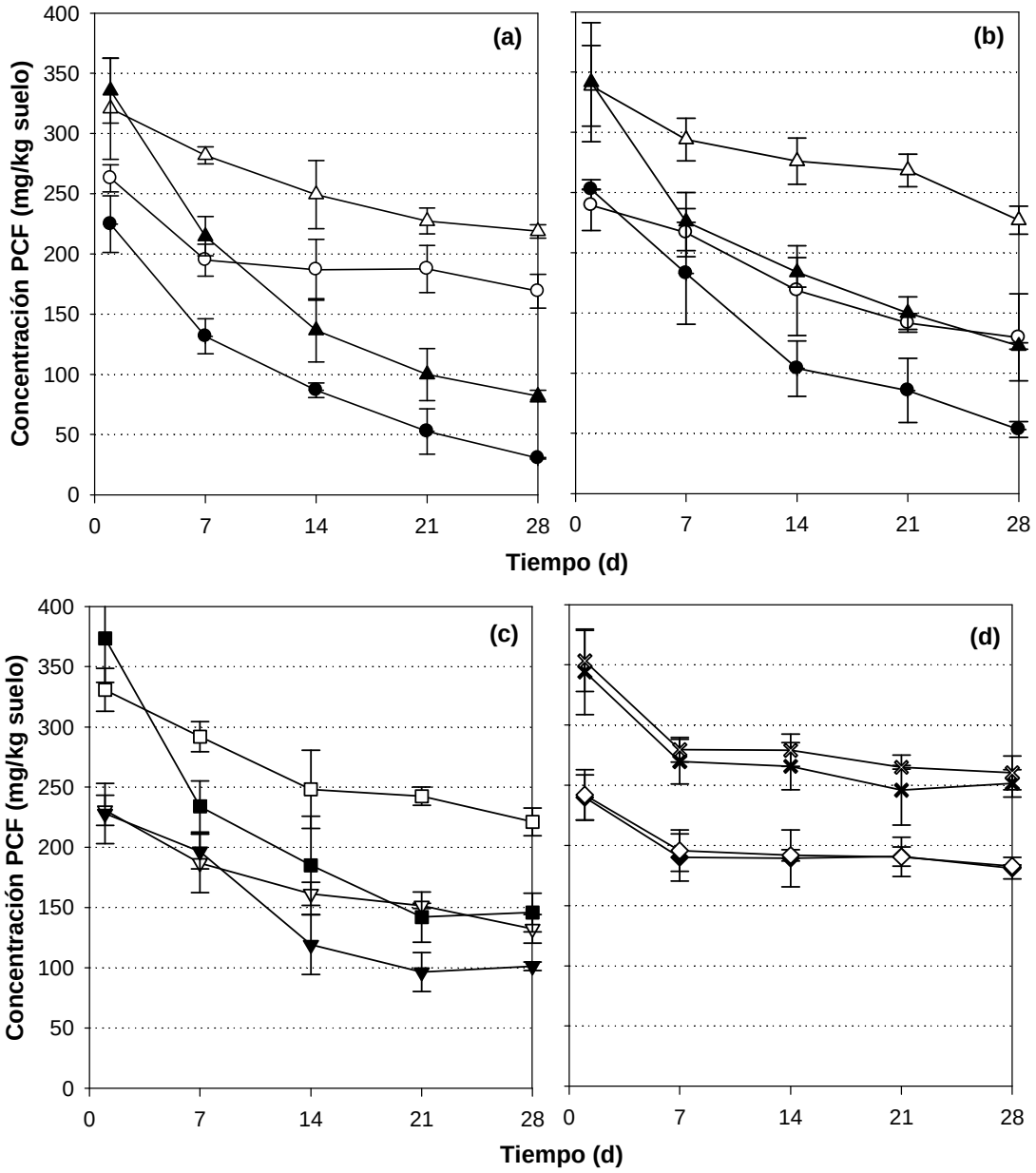

Figura 4.4. Concentración residual de PCF en suelo (250 y 350 mg/kg) utilizando *Anthracophyllum discolor* (a) y *Phanerochaete chrysosporium* (b) con hongo como micelio libre (○,Δ) y colonizado en grano de trigo (●,▲), por microflora del suelo (c) sin (∇, □) y con granos de trigo (▼,■). Controles estériles (d) (♦, ×). Símbolos abiertos control sin granos de trigo y cerrados con granos de trigo

En la Tabla 4.3 se presenta la velocidad de remoción de PCF durante los primeros 14 días y los 14 días posteriores de incubación, obtenida mediante la linearizacion de la concentraciones removidas de PCF, obtenida de la Figura 4.4a,b y c.

En Figura 4.2 se observa que se presentan dos etapas durante el periodo de incubación, una de rápida velocidad, seguida por una etapa considerablemente más lenta. Este efecto fue encontrado en todos los tratamientos evaluados (Tabla 4.3).

Por otra parte, las velocidades de remoción de PCF más elevadas fueron las obtenidas con la aplicación de *A. discolor* y *P. chrysosporium* colonizados sobre granos de trigo (micelio en soporte), siendo muy similares entre ambas cepas (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Velocidad de remoción de PCF (250 y 350 mg/kg) durante los primeros 14 días de incubación (etapa 1) y los 14 días posteriores (etapa 2), en tratamientos con *A. discolor* y *P. chrysosporium*, como micelio libre y colonizados sobre granos de trigo (micelio en soporte)

Tratamiento	250 mg/kg Velocidad de remoción (mg/kg d)		350 mg /kg Velocidad de remoción (mg/kg d)	
	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 1	Etapa 2
A. discolor-micelio libre	1,8	0,3	1,7	0,5
A. discolor- micelio en soporte	2,0	0,5	2,1	0,4
P. chrysosporium-micelio libre	1,6	0,6	1,7	0,8
P. chrysosporium-micelio en soporte	2,0	0,4	2,0	0,5
Suelo natural sin soporte	1,7	0,5	1,7	0,4
Suelo natural con soporte	1,8	0,2	2,1	0,1

Se ha reportado que en ensayos realizados con *P. chrysosporium* se presentan dos fases de degradación (Lamar y Dietrich, 1990, McGrath y Singleton, 2000), debido a que el PCF es rápidamente adsorbido y/o polimerizado en el suelo durante los primeros días de exposición, producto de su alta hidrofobicidad, donde la materia orgánica del suelo juega un rol fundamental

en la adsorción (Czaplicka, 2004) lo que se corrobora con la concentración residual de PCF en los controles (Figura 4.4d), observándose una velocidad de adsorción más rápida a los 7 días de incubación en ambos tipos de tratamiento (con y sin soporte lignocelulósico) y en ambas concentraciones iniciales de PCF. Sin embargo, es posible que la mayor adsorción fuese anterior a los 7 días de cuantificación. Cea (2006), demostraron que el 60% del PCF es adsorbido después de 5 minutos de incubación de 10 μmol/L de PCF en isotermas de adsorción con el mismo suelo Alofánico utilizado en este estudio.

En cuanto a la concentración residual de PCF en el suelo, se obtuvo una reducción del contaminante, por todos los tratamientos evaluados, como se muestra en resumen en la Tabla 4.4. La inoculación del suelo con hongo colonizado en granos de trigo generó un efecto altamente positivo en la remoción de PCF, siendo aproximadamente 2 veces mas eficaz que en el suelo inoculado con micelio libre, para ambas cepas y las dos concentraciones evaluadas.

Por otra parte, al comparar la degradación del tratamiento con micelio libre con la degradación por la microflora autóctona del suelo (suelo natural sin hongo y sin soporte), se observa que la degradación de PCF es posible atribuirla a los microorganismos del suelo, ya que ambas concentraciones para las dos cepas evaluadas son similares (Tabla 4.4). Al respecto, McGrath y Singleton (2000), demostraron que la inoculación de *P. chrysosporium* como micelio libre en un suelo contaminado con una concentración de PCF inicial de 250 mg/kg disminuyó a 2 mg/kg, después de 6 semanas de tratamiento, siendo la misma remoción que en un suelo sin hongo, por lo que se atribuyó la remoción del contaminante sólo a la acción de la microflora autóctona del suelo. Una de las causas de este efecto, es la ausencia de una fuente de carbono y nitrógeno para los hongos de pudrición blanca (Moreira *et al.*, 2000), ya que no se observó crecimiento de las cepas bajo estas condiciones de cultivo.

Efecto contrario se observó con el tratamiento con hongos colonizados en grano de trigo (Tabla 4.4). De una concentración inicial de 250 mg/kg, *A. discolor* y *P. chrysosporium* removieron 194,5 y 199,4 mg/kg, respectivamente y en el suelo natural con la aplicación del soporte se removió 126,9 mg/kg. Por lo tanto, bajo estas condiciones se observó un efecto sinérgico entre los hongos y la microflora autóctona del suelo, de lo cual 67,6 y 72,6 mg/kg es atribuido a la acción de *A. discolor* y *P. chrysosporium*, respectivamente. Así mismo, de una concentración

inicial de aproximadamente 350 mg/kg, la concentración de PCF atribuida a la acción de *A. discolor* y *P. chrysosporium* fue 34,7 y 21,6 mg/kg, respectivamente.

La adición de material lignocelulósico al suelo natural (sin hongo), permitió la proliferación de microorganismos con capacidad degradativa sobre el PCF, aumentando la remoción del contaminante en relación al tratamiento con suelo natural y sin material lignocelulósico (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Efecto de la aplicación de *A. discolor* y *P. chrysosporium* como micelio libre y colonizado en granos de trigo en la concentración de PCF (250 y 350 mg/kg) removido después de 28 días de tratamiento

Suelo	Soporte	Hongo	250 mg/kg	350 mg/kg
			Remoción (mg/kg)	Remoción (mg/kg)
Natural	-	*A. discolor*	93,8	101.9
Natural	+	*A. discolor*	194,5	253,7
Natural	-	*P. chrysosporium*	109,9	111,6
Natural	+	*P. chrysosporium*	199,4	219,0
Natural	-	-	98,5	109,6
Natural	+	-	126,9	197,9
Estéril	-	-	58,7	92,5
Estéril	+	-	59,1	93,0

+: con granos de trigo como material lignocelulósico y -: sin granos de trigo como material lignocelulósico

La microflora autóctona del suelo puede afectar la colonización de los hongos de pudrición blanca en el suelo, mediante un efecto antagónico. Estudios realizados por Radtke *et al.* (1994), demostraron que bacterias del suelo, principalmente del género *Pseudomona* son capaces de inhibir fuertemente el crecimiento de *P. chrysosporium*, por la síntesis de derivados de fenazina. Sin embargo, efectos sinérgicos han sido encontrados por otros estudios con diversos contaminantes. Kotterman *et al.* (1998), mostraron una interacción positiva entre hongo y la microflora autóctona del suelo en la biodegradación de benzo(a)pireno con *Bjerkandera adusta*. Así mismo, con *Dichomitus squales* y *Pleurotus* sp. mostraron un aumento entre 5 y 20% en la

degradación de pireno, en relación a la degradación realizada sólo con la microflora autóctona del suelo (Wiesche *et al.*, 1996)

Se ha indicado también que el antagonismo disminuye cuando se inoculan los hongos sobre material lignocelulósico y luego son esparcidos sobre el suelo contaminado (Reddy y Mathew, 2001). Clausen *et al.* (1996), en una revisión bibliográfica realizada en la asociación de bacterias y hongos para la degradación de la madera, postula un asociación simbiótica, donde las bacterias colonizan el material lignocelulósico incrementando la permeabilidad de esté y posteriormente se realiza el ataque de los hongos.

El crecimiento de hongos en el suelo por adición de un material lignocelulósico puede impedir en cierto modo el efecto competitivo de la microflora del suelo y así aumentar la degradación del contaminante. Sin embargo, este efecto no ocurre cuando los microorganismos del suelo son capaces de utilizar el substrato lignocelulósico, por lo que pueden inhibir el crecimiento del hongo, evitando la descomposición de la lignina y celulosa y en consecuencia disminuir la actividad ligninolítica (Lang *et al.*, 2000).

En cuanto a la actividad enzimática producida por los hongos en este estudio, se observó que la máxima actividad de la enzima MnP de *A. discolor* colonizado en granos de trigo fue de 2,28 U/g y para *P. chrysosporium* fue 0,49 U/g, ambos a una concentración inicial de PCF de 250 mg/kg, mientras que a una concentración de 350 mg/kg la actividad de la enzima MnP para *A. discolor* y *P. chrysosporium* fue de 1,83 y 0,12, respectivamente (Figura 4.5). La actividad de la enzima fue afectada con la concentración de PCF en el suelo, y en relación a la actividad detectada solamente con el soporte presentado en la Figura 4.1, anteriormente descrita, se demuestra un efecto negativo de la microflora del suelo sobre la actividad ligninolítica principalmente para el cultivo con *P. chrysosporium.*

Estos resultados sugieren que *A. discolor* tiene un gran potencial para colonizar el suelo y competir con la microflora autóctona de éste. Sin embargo, considerando la remoción de PCF y la actividad de la enzima MnP de *P. chrysosporium,* es posible concluir que una mayor actividad ligninolítica no necesariamente es un estado fisiológico óptimo para promover la degradación del contaminante.

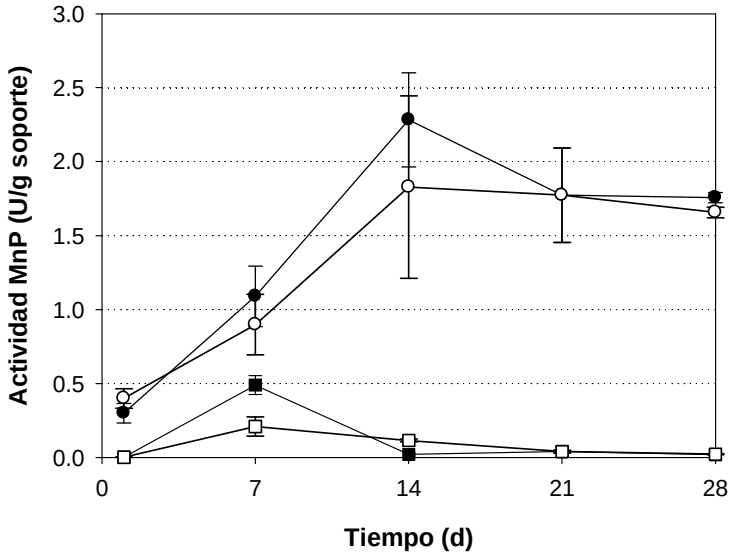

Figura 4.5. Actividad de la enzima MnP de *Anthracophyllum discolor* (●) y *Phanerochaete chrysosporium* (■) colonizados en granos de trigo e inoculados en suelo Andisol contaminado con PCF. Símbolos cerrados representan el suelo contaminado con 250 mg/kg y símbolos abiertos con 350 mg/kg

4.3.4 Efecto del tipo de suelo sobre la degradación de PCF por el hongo de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor*

Se evaluó el efecto de dos tipos de suelos: Andisol (cultivo) y Umbrisol (cultivo y forestal), (las características fueron presentadas en la Tabla 4.1) sobre la remoción de 250 mg/kg por *A. discolor* colonizado en granos de trigo. Los resultados son mostrados en la Figura 4.6.

Se realizaron suelos controles (suelos esterilizados) con el objetivo de evaluar la adsorción de PCF en cada uno de los suelo.

Se observaron diferencias significativas entre el suelo Andisol y el Umbrisol de cultivo (Figura 4.6a), siendo mayor la adsorción en el suelo Umbrisol (cultivo). También se evaluó el efecto de la microflora autóctona de los suelos sobre la remoción de PCF, observándose diferencias significativas entre el suelo Andisol y Umbrisol forestal (Figura 4.6b).

En el tratamiento con hongo colonizado en granos de trigo se observó diferencias significativas entre todos los suelos (Figura 4.6c), siendo más eficaz el tratamiento en el suelo Andisol.

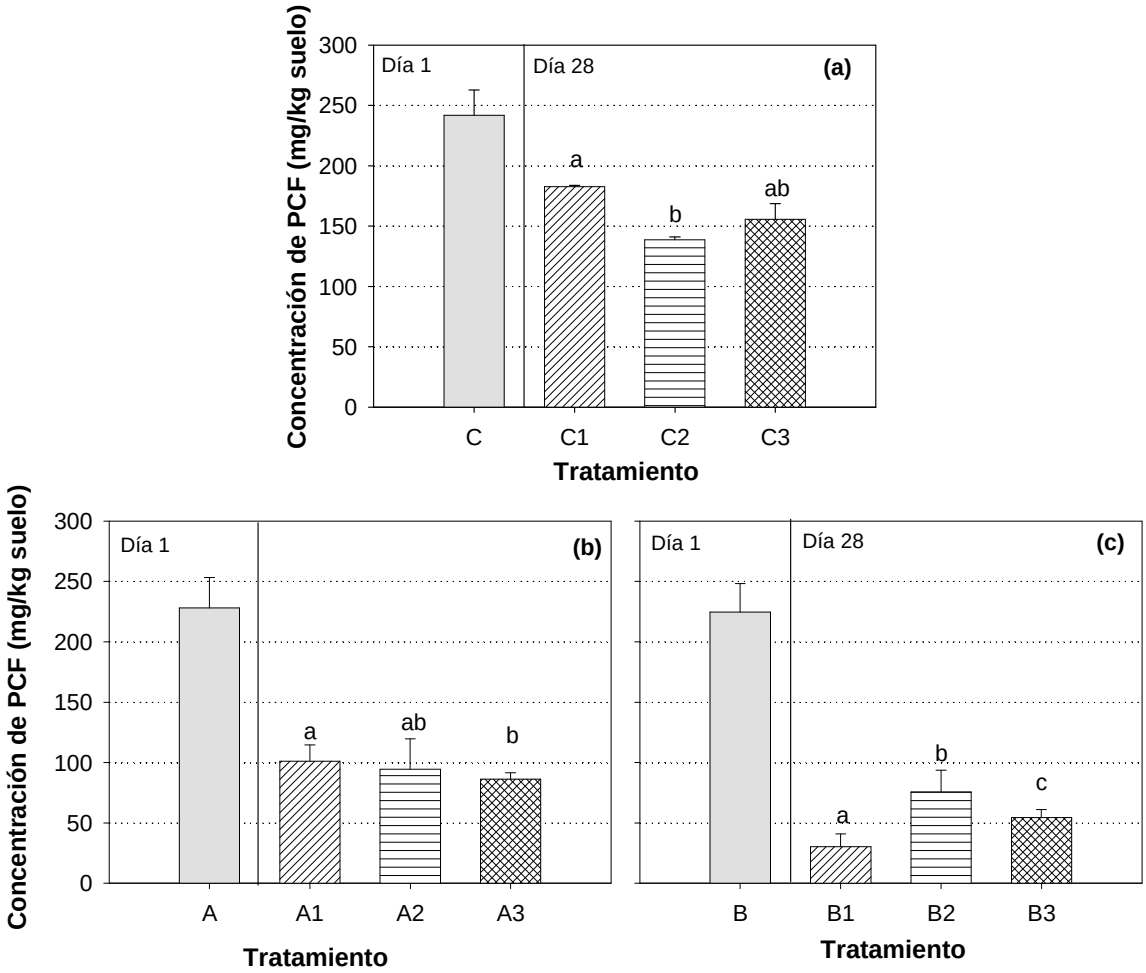

Figura 4.6. Concentración residual de PCF en relación a los tratamientos: (a): adsorción, (b): remoción en suelo natural y (c): remoción por aplicación de *A. discolor* colonizado en granos de trigo. C: Controles estériles, A: suelo natural y B: suelo inoculado con *A. discolor* colonizado en granos de trigo; 1: Suelo Andisol (cultivo), 2: Suelo Umbrisol (cultivo) y 3: Suelo Umbrisol (forestal). Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre los suelos utilizados, basados en el test de Duncan ($p<0,05$)

En la Tabla 4.5 se presenta la concentración de PCF adsorbida en los suelo, removida por acción la microflora autóctona del suelo y removida por *A. discolor* colonizado en soporte lignocelulósico (granos de trigo).

En el suelo Andisol la concentración de PCF adsorbida fue de 59,1 mg/kg suelo, correspondiente a un 24,4% de la concentración inicial de PCF adicionada (representada en la Figura 4.6 como día 1), mientras que en los suelos Umbrisol fue de 42,9 (103, 8 mg/kg) y 35,7% (86,4 mg/kg), en el suelo cultivo y forestal, respectivamente (Tabla 4.5). La adsorción de PCF en el suelo esta principalmente regulada por la naturaleza y composición coloidal del suelo y el pH, si se trata de suelos que presentan carga variable (Diez *et al.*, 1999). En este sentido, se ha demostrado que el suelo Andisol tiene una gran capacidad para remover compuestos fenólicos (Navia *et al.*, 2003, Diez *et al.*, 2005). Sin embargo, el suelo Umbrisol presentó una mayor adsorción de PCF. Este efecto puede atribuirse en cierto modo al pH, el que es considerablemente ácido (Tabla 4.1). La adsorción de pentaclorofenol (pKa 4,75) es fuertemente afectada por la variación del pH. En general, en suelos a valores de pH mayores que el pKa de compuestos acídicos, la forma aniónica es dominante y la adsorción decrece considerablemente (Bengtsson *et al.*, 1993). En este contexto, Diez *et al.* (1999), demostraron que la retención de compuestos fenólicos clorados es favorecida a bajo valores de pH, donde existe un predominio de especies protonadas.

Tabla 4.5. Remoción de PCF (concentración inicial de 250 mg/kg) en dos tipos de suelo por adsorción, por la microflora autóctona del suelo y por *A. discolor* inmovilizado en trigo

Tratamiento	Tipo de suelo		
	Andisol (cultivo)	Umbrisol (cultivo)	Umbrisol (forestal)
PCF adsorbido (mg/kg)	59,1	103,8	86,4
PCF removido por microflora del suelo (mg/kg)[1]	67,8	29,8	55,5
PCF removido por tratamiento con *A. discolor* inmovilizado en trigo (mg/kg)[2]	67,6	15,4	28,5

[1]Resultados obtenidos restando la concentración de PCF adsorbido, [2] Resultados obtenidos restando la concentración de PCF adsorbido y la remoción por acción de la microflora autóctona del suelo

Otro de los factores que determina la adsorción de compuestos fenólicos clorados en el suelo es la materia orgánica, la cual adsorbe fuertemente el PCF, producto de la gran hidrofobicidad del contaminante (Tam *et al.*, 1999, Czaplicka, 2004). No obstante, el suelo Umbrisol de cultivo

posee un menor porcentaje de materia orgánica (10%) que el suelo Umbrisol para uso forestal (18%), y el suelo Andisol (14%). En este sentido, Benoit *et al.* (1996), indican que la reactividad de la materia orgánica va a influenciar la adsorción de un contaminante, demostrando mayor afinidad a la materia orgánica fresca. Por lo que se deduce que la materia orgánica del suelo Umbrisol de cultivo es más reactiva y por tanto posee una mayor capacidad de adsorber PCF.

Si bien se observó (Figura 4.6) una alta remoción de PCF en los suelos naturales, por acción de la microflora autóctona del suelo, no se consideró la fracción de PCF adsorbida a cada uno de los suelos, es decir, la fracción no biodisponible a la acción del hongo. Por tanto, la concentración de PCF removida en los suelos naturales menos la fracción adsorbida en los suelos, indica la remoción de PCF atribuida a la acción de la microflora autóctona del suelo, lo que se muestra en la Tabla 4.5. Al respecto, 67,8 mg/kg, correspondiente a un 29,7% de la concentración inicial de PCF, removió la microflora autóctona del suelo Andisol, y un 13,1% (29,8 mg/kg) y 24,3% (55,5) por los microorganismos de el suelo Umbrisol de cultivo y forestal, respectivamente, después de 28 días de tratamiento. Aunque no se realizó un recuento de colonias, ni aislamientos de bacterias del suelo, es posible inferir que en el suelo Andisol y el suelo Umbrisol forestal los microorganismos del suelo poseen mayor capacidad degradativa, que en el suelo Umbrisol de cultivo.

Así mismo, para determinar la concentración de PCF removida por *A. discolor,* es necesario considerar la concentración de PCF adsorbida y la removida por la acción de los microorganismos del suelo. Por lo que la remoción atribuida a la acción de *A. discolor* colonizado en granos de trigo, fue de 30,1% (67,6 mg/kg), de la concentración inicial de PCF en suelo Andisol (aproximadamente 250 mg/kg), mientras que para el suelo Umbrisol de cultivo y forestal, se obtuvo una remoción de 6,9 y 12,7%, respectivamente (Tabla 4.5). En todos los suelos se observó un efecto sinérgico entre los microorganismos del suelo y el hongo *A. discolor*, con mayor efecto en el suelo Andisol.

El tipo de suelo también afectó la actividad MnP del hongo *A. discolor*, como se muestra en la Figura 4.7. Se observó una mayor actividad de la enzima MnP en el suelo Andisol con un valor máximo de 2,28 U/g de soporte a los 14 días de incubación, mientras que en el suelo Umbrisol de cultivo y forestal, una máxima actividad MnP de 0,093 y 0,079 U/g de soporte, respectivamente,

a los 7 días de incubación, la que disminuyó hasta llegar a valores cercanos a cero a los 28 días de incubación.

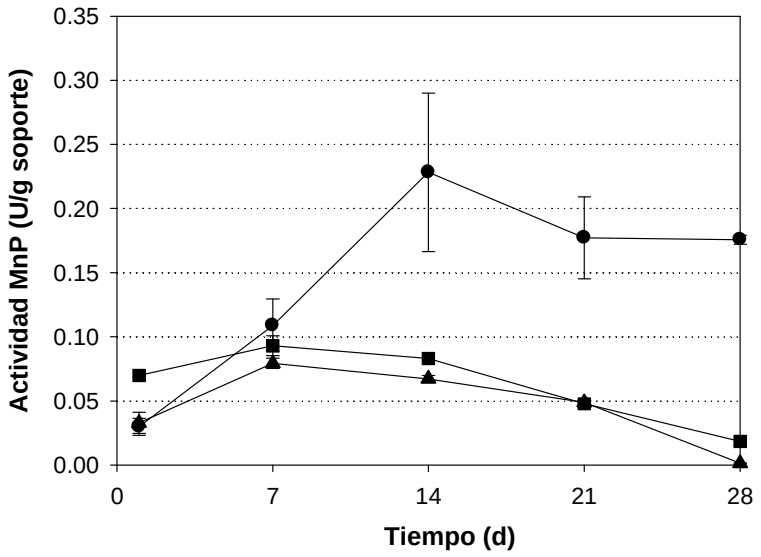

Figura 4.7. Actividad de la enzima MnP de *Anthracophyllum discolor* colonizados en granos de trigo e inoculados en suelo Andisol (●), Umbrisol de cultivo (■) y Umbrisol de uso forestal (▲) contaminados con PCF (250 mg/kg)

En relación a los resultados obtenidos de remoción de PCF y actividad de la enzima MnP, se puede establecer que en el suelo Andisol existe una condición más adecuada para la remoción de PCF, esto probablemente esta dado por la condición de pH, siendo menor la remoción y la actividad de la enzima MnP a mayor acidez del suelo. Estos resultados coinciden con los reportados por Wardle (1992) que demostró que la acidificación de los suelos frecuentemente reduce el metabolismo de los hongos. Sin embargo, estudios realizados por Okeke *et al.* (1996), demostraron que *P. chrysosporium* y *Lentinula edodes* expresan una mayor degradación de PCF en suelo a pH 4.0, la que disminuye cuando el pH es más alcalino. No obstante, este último estudio fue realizado en suelos esterilizados, donde no hay efecto de los microorganismos del suelo.

4.4 CONCLUSIONES

La utilización de materiales lignocelulósico como paja de trigo, viruta de madera y granos de trigo favorecen el crecimiento y colonización por *A. discolor,* siendo los granos de trigo los que permitieron un mayor crecimiento miceliar del hongo.

La inmovilización de *A. discolor* y *P. chrysosporium* en granos de trigo, favorecen la colonización de los hongos en el suelo y la remoción de PCF, en relación a la inoculación como micelio libre.

Los hongos de pudrición blanca *A. discolor* y *P. chrysosporium* colonizados en granos de trigo, demostraron capacidades degradativas similares, por lo que son considerados potenciales inóculos para la biorremediación de suelos contaminados con PCF.

La aplicación de trigo en el suelo, permite la proliferación de microorganismos degradadores de PCF, los que tienen un efecto sinérgico con *A. discolor* y *P. chrysosporium* incrementando la remoción de PCF en suelos contaminados.

Los resultados obtenidos sugieren que el pH y la materia orgánica en el suelo afectan la adsorción de PCF y en consecuencia la biodisponibilidad del contaminante a la acción biológica, siendo más elevada en suelos ácidos y cuando la materia orgánica es más reactiva.

Los suelos ácidos reducen la la producción de la enzima MnP por *A. discolor,* afectando la degradación de PCF.

CAPÍTULO 5

BIODEGRADACIÓN DE PENTACLOROFENOL EN CULTIVOS CON SUELO EN FASE *SLURRY* POR *Bjerkandera adusta* Y *Anthracophyllum discolor* [1]

RESUMEN

En la biorremediación de suelos contaminados, los fenómenos de transferencia de materia pueden presentar una importante limitación del proceso. En este capítulo, se evaluó la degradación de PCF en un suelo de uso forestal, mediante un sistema con suelo en fase *slurry*. Se emplearon los hongos de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor* y *Bjerkandera adusta* BOS55. Se realizaron ensayos en matraces con el fin de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de PCF (100, 250 y 350 mg/kg), la adición de un material lignocelulósico proveniente de una planta de etanol, conocido como granos secos de destilería con solubles (DDGS) y el efecto de la microflora autóctona del suelo.

Una elevada degradación de PCF se obtuvo con *A. discolor* usando DDGS (95% después de 28 días). La utilización de DDGS como fuente de carbono y nitrógeno incrementó la degradación de PCF y la producción enzimática ligninolítica en ambas cepas de hongos utilizadas, aunque no se encontró una correlación entre estos dos parámetros. Por otra parte, se demostró que la microflora autóctona del suelo ejerció un efecto competitivo sobre los hongos de pudrición blanca, disminuyendo la degradación de PCF.

Se identificaron productos intermedios al proceso degradativo, típicos de la vía degradativa de PCF, por lo que el proceso no fue afectado por la concentración de sólidos y la agitación en un sistema con suelo en fase *slurry*.

Finalmente, el proceso fue realizado en un reactor banco de 5 L, bajo condiciones estériles, e inoculado con *A. discolor*, en el cual el 81% del PCF adicionado (250 mg/kg) fue degradado después de 28 días de tratamiento. La ausencia de actividad MnP en estos cultivos indica, que no es esencial para la degradación de PCF.

O. Rubilar, G. Feijoo, C. Diez, T.A. Lu-Chau, M.T. Moreira and J.M. Lema. (2007). Biodegradation of Pentachlorophenol (PCF) in soil *slurry* cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracophyllum discolor*. Industrial and Engineering Chemistry Research. . 10.1021/ie061678b. In press.

5.1 INTRODUCCIÓN

Los suelos contaminados con pentaclorofenol han sido extensivamente estudiados (Hutzler *et al.*, 1989, Lamar y Dietrich, 1990, Lamar *et al.*, 1990, Harmsen, 1991). Hutzler (1989) demostró que en un suelo con contaminado con PCF a una concentración de 100 mg/kg, la microflora autóctona logra disminuir la concentración a 5 mg/kg, en un periodo de tiempo de 4 meses. Otros estudios han reportado una degradación de PCF de 100 mg/kg a 20 mg/kg en un periodo de 10 a 20 semanas (Harmsen, 1991). Sin embargo, diversos estudios han demostrado una degradación más rápida y con una mayor concentración por acción de hongos de pudrición blanca. Al respecto, Lamar y Dietrich (1990), reportaron que un suelo contaminado con 250 mg/kg e incubado con *P. chrysosporium* y *P. sordida* se degrada un 88 y 91%, respectivamente, en un periodo de 6,5 semanas. También demostraron que gran parte del contaminante fue adsorbido a la fracción orgánica e inorgánica del suelo. Por lo tanto, la biorremediación, sólo resulta eficaz sobre la fracción biodisponible de los contaminantes, mientras que la fracción no biodisponible permanece inalterada. Esta fracción se ve incrementada con el tiempo, debido al efecto del envejecimiento del suelo (Hatzinger y Alexander, 1995).

La agitación y mezcla de una suspensión de suelo en fase líquida, facilita la desagregación y reducción de tamaño de las partículas, permitiendo una mayor exposición de los contaminantes e incrementando así la biodisponibilidad. Este efecto se logra mediante una tecnología reciente de gran interés en las ciencias ambientales, especialmente en la biorremediación de suelos, denominada suelo en fase *slurry*, en donde el suelo en fase acuosa junto con el organismo son mezclados y mantenidos en agitación bajo condiciones controladas (Dean-Ross, 2005, Quintero *et al.*, 2005, Mohan *et al.*, 2006, Quintero *et al.*, 2006). La ventaja de utilizar un sistema de suelo en fase *slurry* es que se tiene un control del proceso, hay un aumento de la solubilidad del químico, se incrementa el contacto entre el microorganismo y el contaminante y por tanto una mayor velocidad de degradación. No obstante, el comportamiento de esta tecnología depende no solamente de la naturaleza de los contaminantes, sino también del tipo de suelo, la concentración del contaminante, la carga de sólidos en el sistema y el tipo y origen de los microorganismos degradadores.

La mayoría de los estudios en suelo en fase *slurry* para la degradación de diferentes contaminantes han sido realizados con cultivos bacterianos (Park *et al.*, 2003, Woo *et al.*, 2004,

Quintero *et al.*, 2006), los cuales son mas resistentes al estrés mecánico. Sin embargo, con hongos de pudrición blanca existen muy pocos estudios con esta tecnológia. En un estudio reciente realizado por Valentín *et al.* (2007), reportaron la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) por *Bjerkandera adusta* en biorreactor con suelo en fase *slurry*, en el cuál se investigaron las condiciones óptimas de operación en relación a la preparación del inóculo, concentración de glucosa y la acción sinérgica o antagónica entre la microflora del suelo y el hongo estudiado, de lo que obtuvieron una elevada degradación de PAH (30 mg/kg), después de 30 días de operación del reactor a condiciones óptimas.

Por otra parte, la utilización de glucosa como fuente de carbono, es altamente costoso si se considera realizar el tratamiento a una mayor escala, por lo que una alternativa viable es utilizar un residuo lignocelulósico de un proceso industrial. En este sentido, una industria de etanol, genera un residuo como subproducto de una planta de etanol, conocido como granos secos de destilería con solubles (*Dried Distillers Grains with Solubles* (DDGS)). El DDGS se obtiene mediante secado de los residuos del proceso de obtención de etanol como biocombustible, a partir de diversos ingredientes ricos en almidón (principalmente maíz, trigo y cebada), contiene fundamentalmente residuos no fermentados de los granos originales además de levadura, nutrientes solubles y las partículas de granos más finas.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la degradación de PCF en suelo en fase *slurry* por *Anthracophyllum discolor* y *Bjerkandera adusta* (cepa control). Se evaluó el efecto de la concentración de PCF, la fuente de carbono (glucosa y DDGS) y la acción de la microflora autóctona del suelo sobre la capacidad degradativa de ambas cepas de hongos. Además, el proceso de degradación fue realizado en un reactor de tanque agitado a escala banco de 5 L.

5. 2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Microorganismos

Hongos de pudrición blanca

Se utilizaron las cepas *Bjerkandera adusta* BOS55 (ATCC 90940), de la colección de cultivos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Santiago de Compostela (España), y *Anthracophyllum discolor*, obtenido de la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de La Frontera. Los medios y condiciones de cultivos para los hongos de pudrición blanca son los descritos previamente en la sección 4.2.2.

5.2.2 Suelo utilizado

Se utilizó un suelo de uso forestal no contaminado de textura franco-arenosa-limoso, proveniente de Santiago de Compostela, España. El suelo fue extraído de una profundidad de 15 cm, tamizado hasta un tamaño de partícula inferior a 2 mm y almacenado en envase plástico a una temperatura de 4ºC para su uso posterior. La caracterización físico-química del suelo utilizado se presenta en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Características físico-químicas del suelo de uso forestal

Característica	**Unidad**
Estructura	Franco-arenoso-limoso
pH	4,04
Carbono orgánico (%)	7,85
Nitrógeno (%)	0,55
Humedad (%)	18
Materia orgánica (%)	13,5
CEC (cmolc/Kg)	4,98

CEC: Capacidad de intercambio catiónico, definido como la cantidad de cationes intercambiables que pueden ser adsorbido en el suelo a pH 7

5.2.3 Material lignocelulósico utilizado

Se utilizó un residuo lignocelulósico, generado como subproducto de una planta de etanol, conocido como granos secos de destilería con solubles (*Dried Distillers Grains with Solubles* (DDGS)). Las características del DDGS se presentan en la Tabla 5.2. Los datos fueron obtenidos de la página web de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA).

Tabla 5.2. Composición química del DDGS

Característica	**%**
Humedad	9,8
Cenizas	4,4
Proteína bruta	29,1
Fibra neutro detergente (FND)	41,3
Fibra ácido detergente (FAD)	14,7
Lignina ácido detergente (LAD)	3,9
Almidón	4
Azúcares	1,8

5.2.4 Preparación de material lignocelulósico y del suelo utilizado

Preparación de material lignocelulósico

Se agregó 1,5 g de DDGS a tubos de ensayo. Luego, los tubos de ensayos fueron sellados y llevados al autoclave a 121ºC por 40 minutos dos veces consecutivas.

Preparación del suelo

Se agregó 10 g de suelo en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Previo a la utilización éste fue autoclavado a 121ºC por 40 minutos dos veces consecutivas. A cada uno de los matraces se adicionó de la disolución concentrada de PCF, para obtener concentraciones de 100, 250 y 350

mg/kg. Posteriormente, el suelo fue agitado vigorosamente en los matraces y mantenidos bajo campana de flujo laminar durante 24 horas para la evaporación del solvente.

Para los ensayos donde se evaluó el efecto de la microflora autóctona del suelo, se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero con suelo natural y contaminado a una concentración de PCF de 250 mg/kg.

5.2.5 Ensayos de biodegradación de PCF en cultivos en suelo en fase *slurry* por *Bjerkandera adusta* y *Anthracophyllum discolor*

Efecto de la concentración de PCF en la capacidad degradativa de Anthracophyllum discolor y Bjerkandera adusta en cultivos con suelo en fase slurry

Los ensayos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 125 mL en triplicado. Cada matraz contenía 2 g de suelo contaminado con PCF (100, 250 y 350 mg/kg) y 16 mL de medio Kirk modificado, descrito en la sección 3.2.3. El inóculo fue agregado como micelio homogenizado de *B. adusta* ó *A. discolor* (4 mL), según lo descrito en la sección 4.2.2. También se realizaron controles abióticos sin hongos, los que fueron incubados en paralelo. Todos los matraces fueron incubados a 30ºC y a 170 rpm por 4 semanas en un agitador orbital.

La toma de muestra se realizó retirando matraces de cultivo periódicamente para determinar la concentración residual de PCF y la actividad de la enzima MnP. En los ensayos realizados con *A. discolor* se identificaron productos de degradación de PCF.

Utilización de DDGS como substrato por Anthracophyllum discolor y Bjerkandera adusta

Para evaluar el posible uso de DDGS como substrato para los hongos, se realizaron cuatro ensayos en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían: a) DDGS (1,5 g) y agua (16 mL) inoculado con 4 mL de micelio homogenizado (descrito en la sección 4.2.2), b) DDGS (1,5 g), suelo no contaminado (2 g) y agua (16 mL) inoculado con 4 mL de micelio homogenizado, c) control abiótico con suelo no contaminado (2 g) y agua (20 mL) y d) medio Kirk modificado: 16 mL (como se describe en la sección 3.2), suelo no contaminado (2 g) inoculado con 4 mL de micelio homogenizado.

La toma de muestra se realizó retirando periódicamente 0,5 mL de muestra de cada matraz para determinar la actividad de la enzima MnP y pH.

Al inicio y al término del periodo de incubación se determinó el peso seco del material lignocelulósico a 105ºC, para obtener la degradación por acción de los hongos.

Efecto de la concentración de PCF en la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca en cultivos con suelo en fase slurry con DDGS como substrato

Los ensayos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Cada matraz contenía 2 g de suelo contaminado con PCF (100, 250 y 350 mg/kg) con 1,5 g de DDGS. El inóculo fue agregado como micelio homogenizado de *B. adusta* ó *A. discolor* (4 mL), según lo descrito en la sección 4.2.2. Se realizaron controles abióticos sin hongos, los que fueron incubados en paralelo. Todos los matraces fueron incubados en triplicado a 30ºC y a 170 rpm por 4 semanas en un agitador orbital.

La toma de muestra se realizó tomando matraces de cultivo periódicamente para determinar la concentración residual de PCF y la actividad de la enzima MnP.

Efecto de la microflora autóctona del suelo sobre la remoción de PCF en cultivos con suelo en fase slurry por Anthracophyllum discolor y Bjerkandera adusta

El efecto de la microflora autóctona del suelo en la degradación de PCF fue evaluado en experimentos con suelo no estéril y estéril inoculados con *B. adusta* y *A. discolor,* de la misma forma como se realizó el ensayo anterior. La fuente de carbono usada en estos cultivos fue DDGS y el suelo fue contaminado con una concentración inicial de PCF de 250 mg/kg.

La toma de muestra se realizó tomando matraces de cultivo periódicamente para determinar la concentración residual de PCF y la actividad de la enzima MnP.

Remoción de PCF por Anthracophyllum discolor en biorreactor con suelo en fase slurry operado en modo batch

Se utilizó un reactor de vidrio de 5 L de capacidad total y operado con un volumen de 4 L. El reactor fue equipado con un motor y un impulsor tipo turbina operado a 250 rpm. El cuerpo del reactor era cilíndrico y curvado en el fondo (Figura 5.1). La tapa contenía cinco orificios de entrada: para el eje del agitador, el electrodo de pH, la carga de materiales, toma de muestra y un condensador por donde circuló agua a 5ºC, con el fin de evitar la eliminación de PCF por volatilización. Se inoculó con 20% (400 mL) de *A. discolor* proveniente del cultivo en frasco Erlenmeyer, según lo descrito en la sección 4.2.2. Posteriormente, se agregó 200 g de suelo previamente contaminado con PCF a una concentración de 250 mg/kg (carga de sólido 5%) y finalmente se agregó medio Kirk modificado hasta completar el volumen de 4 litros en el reactor. Después del consumo total de glucosa se agregó pulsos alternados de glucosa/peptona en concentraciones de 2 g/L y 0,4 g/L, respectivamente, con el fín de mantener la viabilidad del hongo en el reactor. El pH fue mantenido a un valor entre 4,5 y 5,5, mediante la adición de NaOH 0,1N ó HCL 0,1N. La temperatura al interior del reactor fue mantenida a 30ºC, mediante recirculación de agua alrededor del reactor, proveniente de un baño termoregulado. El caudal de aire fue de 2 L/min.

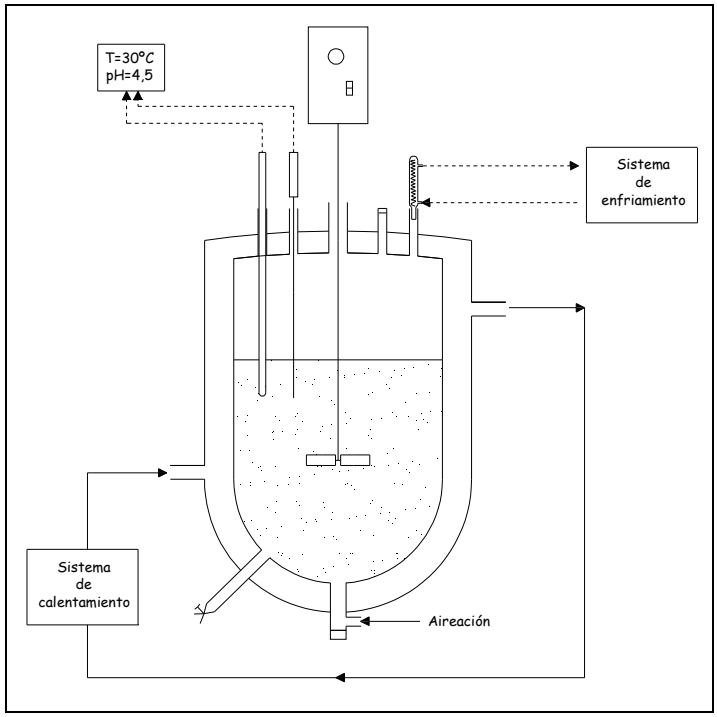

Figura 5.1. Reactor de tanque agitado de 5 L

Para la toma de muestra del reactor se aumentó la agitación a 500 rpm. Posteriormente se purgó aproximadamente 20 mL de muestra, para luego tomar 80 mL de muestra, de la cuál se extrajo 20 mL en triplicado, en la que se determinó concentración de PCF residual, actividad de la enzima MnP, pH y concentración de glucosa.

5.2.6 Metodología analítica

Extracción y análisis de PCF e identificación de productos de degradación

Para la extracción de PCF de los matraces y la muestra extraída del reactor, se agregó 40 mL de una solución hexano-acetona (1:1 v/v) y se siguió el procedimiento descrito previamente en la sección 4.2.5.

El PCF residual y los productos de degradación fueron determinados por medio de un cromatógrafo de gases Variant-Statum GC/MS (CP 3900), equipado con un puerto de inyección *split-splitless* y un inyector automático (CP-8400) conectado a un espectrómetro de masas con trampa de iones (Varian Saturn 2100). Se utilizó una columna capilar CP-Sil 8 CB low Bleed/MS fused sílica WCOT (30 m longitud y 0,25 mm ID). El volumen de inyección fue de 1 µL vía una inyección *split-less* a 280 ºC. Se usó gas helio como fase móvil a un flujo de 1 mL/min. La detección y cuantificación de metabolitos de degradación se realizó mediante el método descrito por Quintero *et al.* (2005). El gradiente de temperaturas empleado fue el siguiente: 2 minutos de tiempo de sostenimiento a 60 ºC, incremento de temperatura a 20 ºC/min hasta 180 ºC, incremento de temperatura a 5 ºC/min hasta 200 ºC y finalmente otro incremento de temperatura a 10 ºC/min hasta 300 ºC.

Determinación de actividad MnP y glucosa

La actividad MnP fue determinada desde el sobrenadante de una muestra previamente centrifugada (10 min a 5000 rpm), mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol, espectrofotométricamente a 30 ºC (Cecil CE 7200, UK), descrita previamente en la sección 3.2.4. La actividad MnP fue determinada para todos los ensayos anteriormente descritos.

La concentración de glucosa fue determinada mediante un método enzimático comercial GOD-POD (Spinreact S.A., España).

5. 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la degradación de PCF en un sistema con suelo en fase *slurry* por *Bjerkandera adusta* y *Anthracophyllum discolor* con un medio sintético y con un residuo lignocelulósico proveniente de una planta de bioetanol, ambos en matraces y en agitación. Posteriormente, se evaluó la degradación en un reactor con suelo en fase *slurry* inoculado con *A. discolor.*

5.3.1 Efecto de la concentración de PCF en la capacidad degradativa de *Anthracophyllum discolor* y *Bjerkandera adusta* en cultivos con suelo en fase *slurry*

La degradación de PCF por *B. adusta* y *A. discolor* en cultivos con suelo en fase *slurry* fue evaluado en experimentos con diferentes concentraciones iniciales (100, 250 y 350 mg/kg). Los resultados se presentan en la Figura 5.2.

Con ambas cepas se observó remoción de PCF. Sin embargo, la velocidad y concentración residual de PCF fue diferente para las dos cepas. Para *B. adusta,* se observó que de una concentración inicial de aproximadamente 100 mg/kg, se removió 56 mg/kg después de 14 días de cultivo, mientras que un total de 71 mg/kg fue removido al finalizar el ensayo (día 28), correspondiente a una remoción final de 82% del total de PCF adicionado. En cuanto a la concentración inicial de 250 y 350 mg/kg, se removió un total de 141 y 228 mg/kg al día 28, respectivamente, correspondiente a una remoción final de 57 y 70% del contaminante, respectivamente (Figura 5.2 a).

Para el ensayo realizado con *A. discolor,* de una concentración inicial de 100 mg/kg, después de 28 días se obtuvo una remoción de 90%. Similares niveles de degradación fueron encontrados para las concentraciones más elevadas de 250 y 350 mg/kg (Figura 5.2b).

En este tipo de tratamiento, al igual que el estudio anterior descrito en el Capítulo 4, Sección 4.3 (en fase sólida), se observaron dos etapas de remoción, una con una rápida velocidad de degradación a los 14 días de cultivo, seguida por una etapa más lenta, la que se incrementó con el aumento de la concentración de PCF. Sin embargo, en este sistema no se observó una adsorción del contaminante, ya que la extracción en los controles (suelo estéril sin hongo) fue superior al 95% durante todas las mediciones, a diferencia del estudio en el Capítulo anterior, donde la

extracción disminuyó durante todas las medición, llegando al 75% de extracción al final del ensayo.

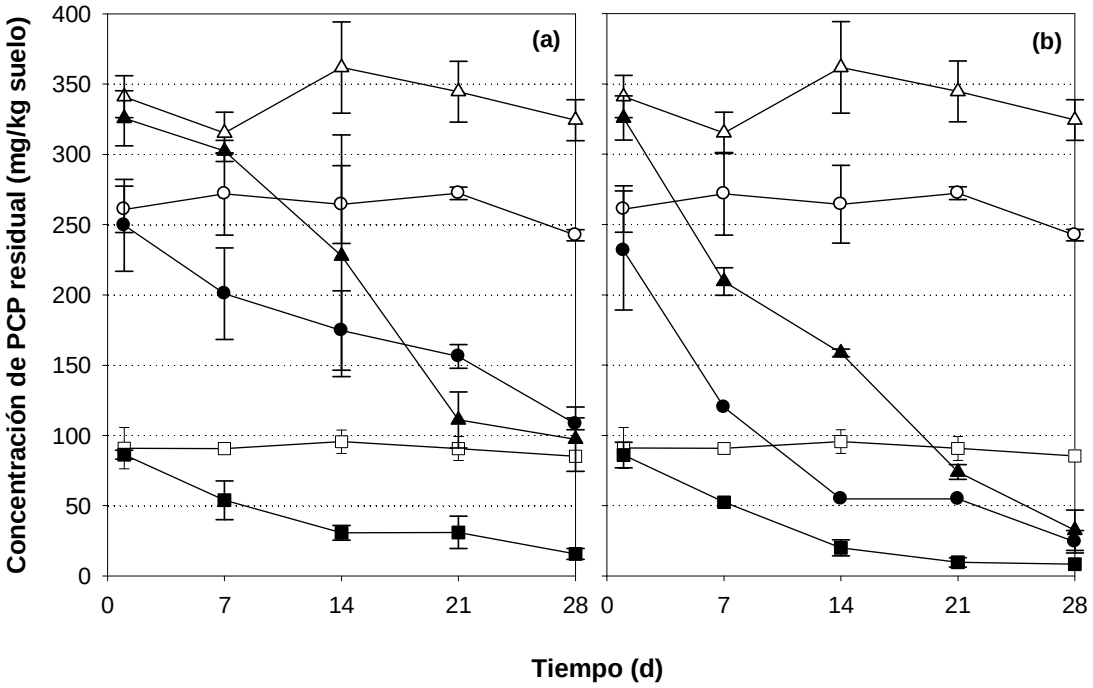

Figura 5.2. Concentración residual de diferentes concentraciones iniciales de PCF en suelo (100 (■), 250 (●) y 350 (▲) mg/kg) utilizando un sistema con suelo en fase *slurry* con medio de cultivo Kirk por (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor (*La concentración residual de PCF de los controles se presentan con símbolos abiertos)

En sistema con suelo en fase *slurry* la biodisponibilidad del contaminante se ve incrementada, debido a la agitación, la que minimiza la formación de agregados y favorece la transferencia de masa y por tanto la biodisponibilidad del contaminante a la acción de los microorganismos empleados en dicho proceso (Dean-Ross, 2005, Quintero *et al.*, 2005, Mohan *et al.*, 2006, Quintero *et al.*, 2006). Efecto contrario se demuestra en sistemas en fase sólida. Al respecto, Lamar *et al.* (1990), evaluaron la degradación de 80 mg/kg de PCF en suelo esterilizado por *P. chrysosporium* y *P. sordida*, con una degradación del 96 y 82%, respectivamente, a los 64 días de incubación. Por otra parte, Okeke *et al.* (1997), demostraron la degradación de PCF en suelo estéril por *Lentinula edodes*, con una concentración inicial de 200 mg/kg (donde sólo 61,2% del

contaminante pudo ser extraído), del cual 66,3±10,9 mg/kg fue removido después de 4 semanas, lo que implica un 54% de reducción de la concentración inicialmente extraída del contaminante. En este trabajo, usando concentraciones similares (250 mg/kg) la cantidad removida fue 3 veces más en el mismo periodo de tiempo por *A. discolor* con suelo en fase *slurry*. Por lo tanto, se demostró que en sistema con suelo en fase *slurry* hay una mayor eficiencia de remoción que en procesos convencionales utilizando hongos de pudrición blanca con suelos en fase sólida.

En cuanto a la actividad de la enzima MnP, ésta fue detectada en los cultivos con ambas cepas, como se muestra en la Tabla 5.3. La máxima actividad fue detectada en cultivos con *A. discolor* con un valor máximo de 485,6 ± 20,5 U/L al día 7 en cultivos con una concentración inicial de PCF de 100 mg/kg. En este caso, se observó un estimulo de la actividad MnP con la adición de PCF, en relación a la actividad del cultivo control (sin PCF). Sin embargo, al aumentar la concentración de PCF a 250 y 350 mg/kg la actividad de la enzima fue considerablemente afectada (en un disminución de alrededor del 75%). Sin embargo, la capacidad degradativa no fue afectada por una disminución de la actividad MnP.

En relación a la actividad enzimática de *B. adusta*, en cultivos con PCF, sólo se detectó al inicio del tratamiento, correspondiendo a la actividad del inóculo adicionado al cultivo. Por lo tanto, la remoción de PCF detectada por *B. adusta*, no se atribuye a la enzima MnP.

Tabla 5.3. Máxima actividad MnP obtenida durante la degradación de PCF por *B. adusta* y *A. discolor* en cultivos en fase *slurry* usando medio Kirk modificado. También se muestra el tiempo en el cual se obtuvo la máxima actividad enzimática

PCF	***B. adusta***		***A. discolor***	
(mg/kg)	MnP (U/L)	Tiempo (d)	MnP (U/L)	Tiempo (d)
0 (Control)	84,2 ± 5,4	14	177,0 ± 4,8	7
100	34,3 ± 2,8	1	485,6 ± 20,5	7
250	40,1 ± 4,4	1	181,0 ± 38,2	7
350	47,8 ± 0,8	1	125,3 ± 22,0	14

Diversos estudios (Hallberg *et al.*, 2003, Montiel *et al.*, 2004) han demostrado que además de la enzimas ligninolíticas, existe la participación de otras enzimas fúngicas celulares y extracelulares, tales como phenoloxidasas y celobiosa dehidrogenasa, que en conjunto con las enzimas ligninolíticas participarían en el proceso degradativo.

5.3.2 Utilización de DDGS como substrato por *Anthracophyllum discolor* y *Bjerkandera adusta*

La degradación de material lignocelulósico por hongos de pudrición blanca ha tenido un gran interés tanto científico como económico, siendo utilizado principalmente para aumentar la digestibilidad de la madera o paja para ser utilizado en la alimentación de animales (Jung *et al.*, 1992), para reducir los costos de operación de la industria de pulpa y papel y actualmente esta siendo objeto de gran interés en la aplicación como sustrato para hongos de pudrición blanca en procesos de degradación de contaminantes (Rodriguez-Vazquez *et al.*, 1999, Walter *et al.*, 2004).

En este estudio se utilizó DDGS como fuente de carbono y nitrógeno para hongos de pudrición blanca en el proceso de degradación de PCF con suelo en fase *slurry*. Dadas las características de este material lignocelulósico (Tabla 5.2), es posible que sea utilizados como fuente de carbono y nutrientes por hongos de pudrición blanca. Sin embargo, es necesario evaluar la factibilidad de ser aplicado en procesos de biorremediación de suelos contaminados con PCF. Walter *et al.* (2004), señalan que la colonización de diferentes substratos lignocelulósicos por hongos de pudrición blanca, no sólo depende de los hongos sino que también depende del tipo de sustrato y que incluso en algunos casos, la colonización puede no estar relacionada con el potencial de degradación. Por lo que se estudió la utilización de DDGS como substrato por los hongos de pudrición blanca evaluados, como ensayo previo a la degradación de PCF en suelo en fase *slurry* con DDGS como fuente de carbono y nitrógeno.

Se evaluó la actividad de la enzima MnP de cultivos con *A. discolor* y *B. adusta* en cuatro diferentes medios con (a) DDGS, (b) mezcla de suelo y DDGS, (c) suelo con medio Kirk y (d) suelo, como se muestra en la Figura 5.3.

Con ambos hongos, fue detectada una elevada actividad enzimática, principalmente en el medio compuesto solamente con DDGS. La mayor actividad de la enzima MnP fue observada en *A. discolor*, con valores máximos de aproximadamente 1600 y 700 U/L, expresadas en el cultivo

compuesto por DDGS y en mezcla de suelo-DDGS, respectivamente (Figura 5.3). Para *A. discolor* la actividad máxima de la enzima MnP en medio solamente con DDGS aumentó 4 veces más que el medio Kirk, mientras que para *B. adusta* se observó un aumento de 6 veces (Figura 5.3).

Estos resultados son similares a los reportados por Moredo *et al.* (2003), usando *P. chrysosporium* y *Trametes versicolor* pre-cultivados en semillas de uva y salvado de cebada, donde mostró una actividad máxima de MnP de 1232 U/L, mientras que *T. versicolor* presentó actividad lacasa de 250 U/L. Para ambos hongos la actividad ligninolítica aumentó dos veces, en relación al cultivo control (sin residuo). Así mismo, resultados similares obtuvieron Kapich *et al.* (2004), en estudios con *P. chrysosporium* cultivados en paja de trigo.

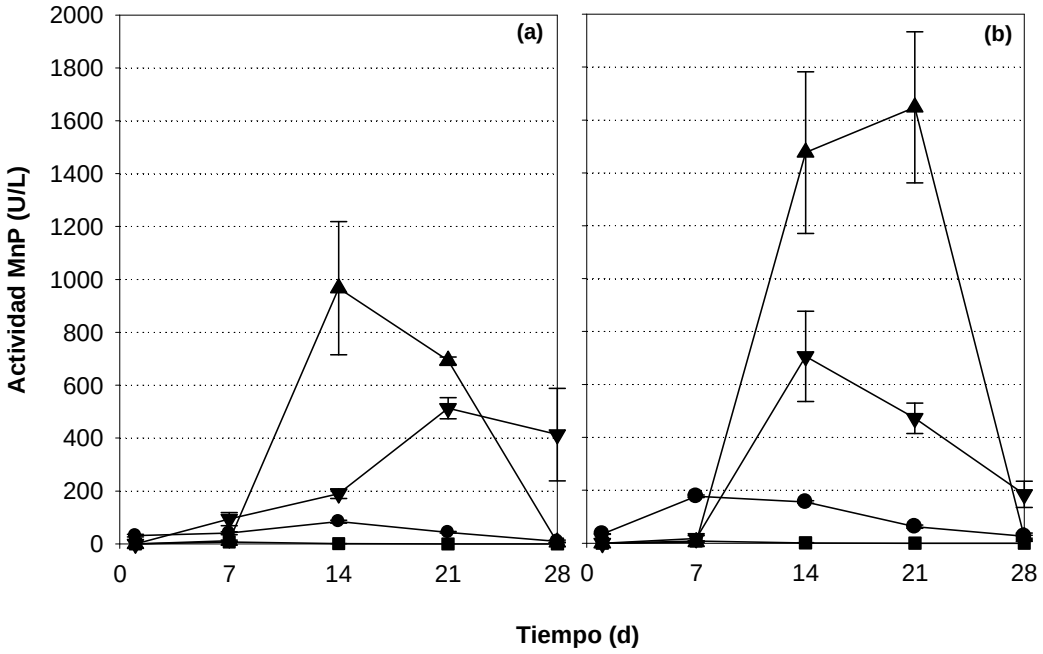

Figura 5.3. Actividad enzimática de MnP. (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor*, en medio con suelo (■), DDGS (▲), mezcla suelo-DDGS (▼) y suelo con medio Kirk (●)

Otro de los parámetros evaluados en el ensayo fue el pH, el que durante el periodo de incubación aumentó desde 5,9 a 7,2 en los cultivos con DDGS con ambos hongos, mientras que en el ensayo

con medio Kirk no fue superior a 6 (Figura 5.4). La producción típica de MnP en el cultivo con medio Kirk se caracteriza por tener un peak de actividad después de los 5-7 días, cuando la fuente de carbono y nitrógeno es consumida. Después de este punto, los niveles de actividad ligninolítica disminuyen, debido a un incremento de la actividad proteolítica (Dosoretz *et al.*, 1990) ó pH (Lu-Chau *et al.*, 2004). En los cultivos con DDGS, la posible causa de inactivación de la actividad de la enzima MnP es el incremento del pH, el que puede ser atribuido a una concentración de amonio en el medio, producto de la utilización de aminoácidos y proteínas del DDGS como substrato.

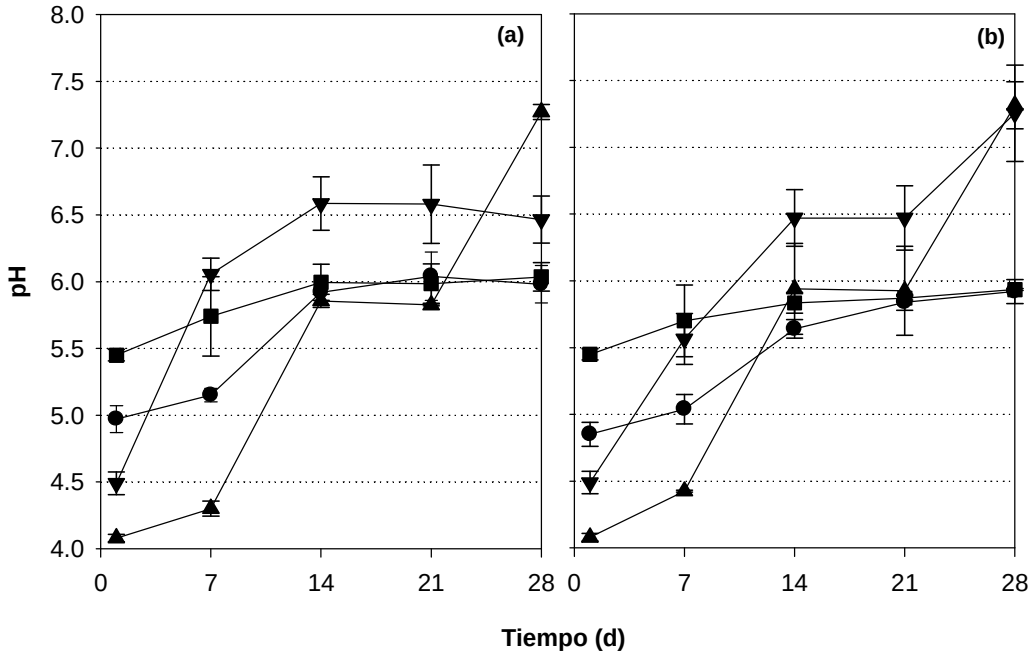

Figura 5.4. Evolución del pH. (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor*, en medio con suelo (■), DDGS (▲), mezcla suelo-DDGS (▼) y suelo con medio Kirk (●)

A pesar de la inactivación de la enzima MnP usando DDGS como substrato, la máxima actividad expresada fue mayor comparado con los resultados obtenidos con el medio Kirk. Por otra parte, se observó que después de 35 días de incubación, *A. discolor* y *B. adusta* degradaron aproximadamente 33,7 y 30,0 %, respectivamente, del DDGS inicial (medido como pérdida de peso de sólidos totales).

Dorado *et al.* (1999) obtuvieron resultados similares al evaluar la degradación y transformación de paja de trigo por acción de los hongos de putrefacción blanca *Pleurotus eryngii, P. chrysosporium, Phlebia radiata* y *Ceriporiopsis subvermispora.* Después 30 días de incubación observaron una pérdida de peso del material lignocelulósico entre 10 y 25% por acción de las cepas evaluadas. Esta pérdida se incrementó al aumentar el periodo de incubación y en el caso de *P. chrysosporium* llegó a 45% después de 60 días.

Por lo tanto, dado que el DDGS y la mezcla con suelo, puede ser utilizado como fuente de nutrientes para el crecimiento y activación del sistema ligninolítico de hongos de pudrición blanca, se evaluó el efecto de diferentes concentración de PCF sobre la capacidad degradativa de *B. adusta* y *A. discolor* utilizando DDGS como substrato.

5.3.3 Efecto de la concentración de PCF en la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca en cultivos con suelo *slurry* con DDGS como substrato

La remoción de diferentes concentraciones iniciales de PCF por *B. adusta* y *A. discolor* en cultivos con suelo *slurry* con DDGS se muestra en la Figura 5.5.

Para una concentración de 100, 250 y 350 mg/kg, *B. adusta*, degradó 93, 70 y 50% del total del PCF adicionado, respectivamente. Por otra parte, *A. discolor* degradó 96, 94 y 76% de 100, 250 y 350 mg/kg del total adicionado, respectivamente.

El uso de DDGS como substrato aumentó la remoción de PCF durante los primeros 14 días, comparado con el cultivo con medio Kirk a las mismas concentraciones de PCF (Figura 5.2 y 5.5). Este efecto fue más evidente en los cultivos de *B. adusta,* en donde la velocidad de degradación de PCF (calculada como mg/kg d) fue incrementada un 11, 100 y 28% en las concentraciones inicialmente adicionadas de 100, 250 y 350 mg/kg.

La actividad MnP en cultivos con suelo en fase *slurry* con DDGS como substrato se presenta en la Tabla 5.4. La actividad enzimática detectada en cultivos con *B. adusta* no fue superior a 56 U/L a una concentración inicial de 100 mg/kg, mientras una elevada actividad MnP (996,0 U/L) fue detectada en el cultivo con *A. discolor* a la misma concentración (Tabla 5.4).

En el cultivo con *A. discolor* la actividad MnP fue estimulada con la adición de PCF a una concentración de 100 mg/kg, en comparación con el medio de cultivo control (sin PCF). Mismo

efecto fue observado en el cultivo con medio Kirk (mostrado en la Tabla 5.3). Sin embargo, con un aumento de la concentración de PCF a 250 mg/kg la actividad MnP disminuyó un 80%, aproximadamente (Tabla 5.4). Este efecto fue más severo en el caso de *B. adusta,* en donde la máxima actividad MnP fue afectada con la presencia de PCF en el medio, disminuyendo hasta 10 veces con la concentración de PCF, cuando se compara con el cultivo control (sin PCF). Así mismo, se detectó sólo la actividad MnP del inóculo a concentraciones de PCF de 250 y 350 mg/kg, ya que la máxima actividad fue al día 1 de incubación.

Por lo tanto, considerando la remoción de PCF y actividad de la enzima MnP de ambas cepas de hongos, se puede concluir que el incremento de concentración de PCF en el suelo ejerce un efecto negativo importante en la actividad ligninolítica de hongos de pudrición blanca. De acuerdo con estos resultados, puede ser hipotetizado que la actividad de la enzima MnP no es el único sistema responsable de la degradación de PCF por las dos cepas estudiadas.

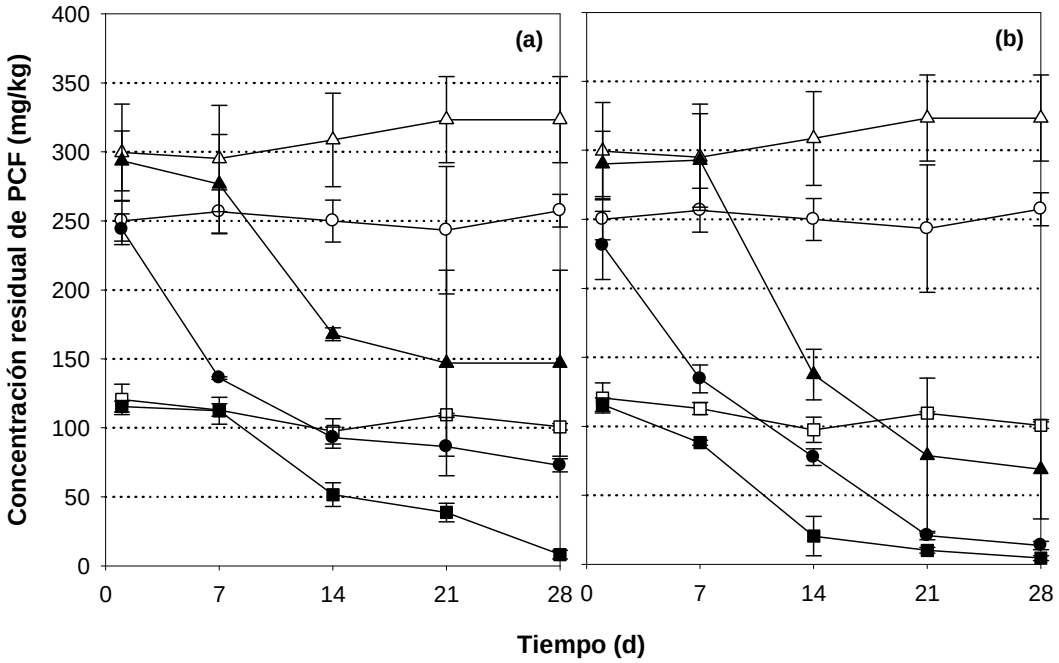

Figura 5.5. Concentración residual de diferentes concentraciones iniciales de PCF en suelo (100 (■), 250 (●) y 350 (▲) mg/kg) utilizando un sistema con suelo en fase *slurry* con DDGS como fuente de carbono por (a) *Bjerkandera adusta* y (b) *Anthracophyllum discolor (*La concentración residual de PCF de los controles se presentan con símbolos abiertos)

Tabla 5.4. Máxima actividad MnP obtenida durante la degradación de PCF por *B. adusta* y *A. discolor* en cultivos con suelo en fase *slurry* usando DDGS como substrato. También se muestra el tiempo en el cual se obtuvo la máxima actividad enzimática

PCF	***B. adusta***		***A. discolor***	
(mg/kg)	MnP (U/L)	Tiempo (d)	MnP (U/L)	Tiempo (d)
0 (Control)	567,6 ± 103,4	21	619,5 ± 165,8	14
100	56,2 ± 8,3	7	996,0 ± 45,0	14
250	36,7 ± 0,4	1	200,5 ± 78,6	14
350	47,7 ± 0,8	1	229,0 ± 16,2	14

5.3.4 Efecto de la microflora autóctona del suelo sobre la remoción de PCF en cultivos con suelo en fase *slurry* por *Anthracophyllum discolor* y *Bjerkandera adusta*

Se evaluó el efecto de la microflora del suelo sobre la degradación de PCF y sobre la actividad de la enzima MnP de los hongos de pudrición blanca. La degradación de 250 mg/kg en suelo estéril y no estéril al día 14 y 28, se presenta en la Figura 5.6. En ambos casos se utilizó DDGS como sustrato, de modo de favorecer el crecimiento fúngico frente a la actividad de microorganismos autóctonos del suelo. A los 14 y 28 días de incubación se observó una degradación menor en el suelo no estéril en relación al suelo estéril (Figura 5.6). Para el suelo inoculado con *B. adusta* en suelo estéril a los 14 días de cultivo, se degradó un 63% de PCF, mientras que en suelo no estéril un 18%, correspondiente a una diferencia de un 45%, mientras que al día 28 la diferencia disminuyó hasta un 21%. A si mismo, para *A. discolor* en suelo estéril, a los 28 días se degradó 96% de PCF y en suelo no estéril un 53%, siendo un 43% mayor el efecto en sistema estéril, por lo que la microflora autóctona del suelo ejerció un efecto antagónico sobre la capacidad degradativa de los hongos de pudrición blanca utilizados.

De mismo modo, se observó el efecto de la microflora autóctona del suelo sobre la degradación de PCF, en la cuál a los 14 días se atribuyó un 15% de degradación de PCF y a los 28 días un 47% del total de PCF adicionado al suelo no estéril (sin hongo). Por lo que la microflora

autóctona del suelo posee una acción degradativa sobre el PCF y una acción inhibitoria sobre los hongos de pudrición blanca (Figura 5.6).

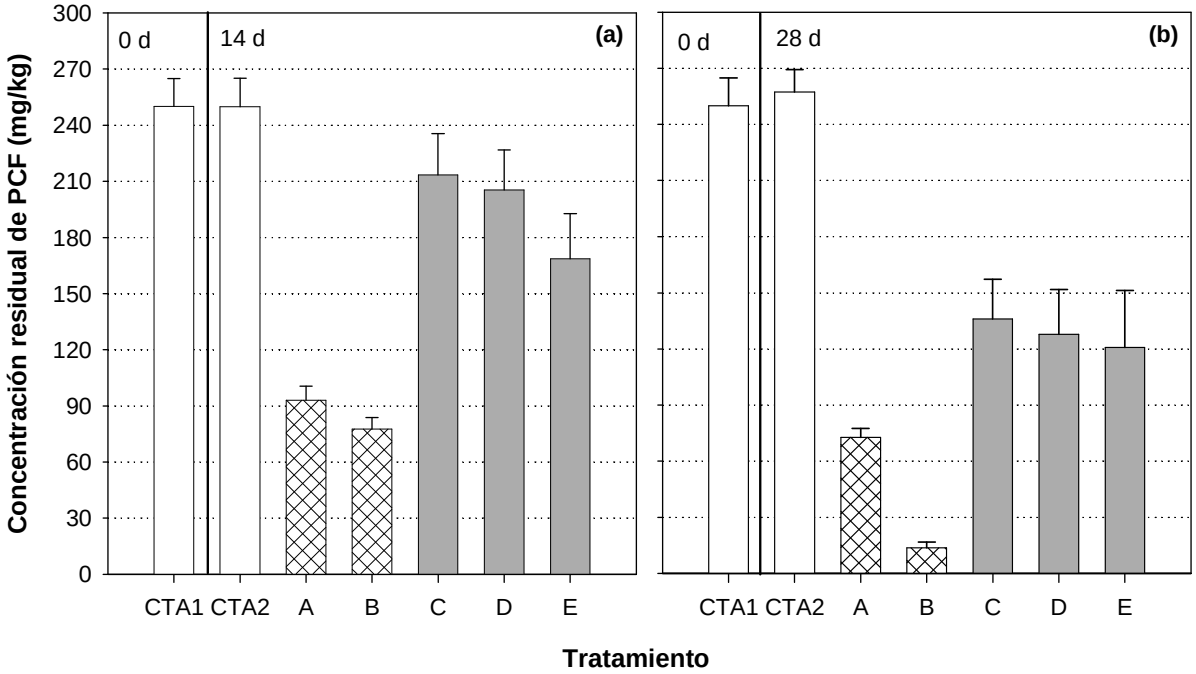

Figura 5.6. Concentración residual de PCF en un sistema con suelo de fase *slurry*, con DDGS como sustrato después de 14 días (a) y 28 días (b) de tratamiento, empleando *Bjerkandera adusta* y *Anthracophyllum discolor*. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: Control abiótico (suelo estéril) (CTA1 y CTA2); Suelo estéril y *B. adusta* (A)*;* Suelo estéril y *A. discolor* (B)*;* Suelo no estéril sin hongo (C); Suelo no estéril y *B. adusta* (D); Suelo no estéril y *A. discolor* (E)

La actividad de la enzima MnP, no fue detectada en el cultivo, para ambas cepas fúngicas evaluadas. La ausencia de la actividad puede ser atribuida por un aumento del pH (Figura 5.7), corroborándose que la presencia de los microorganismos endógenos ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento y la capacidad degradativa de los dos hongos de pudrición blanca estudiados.

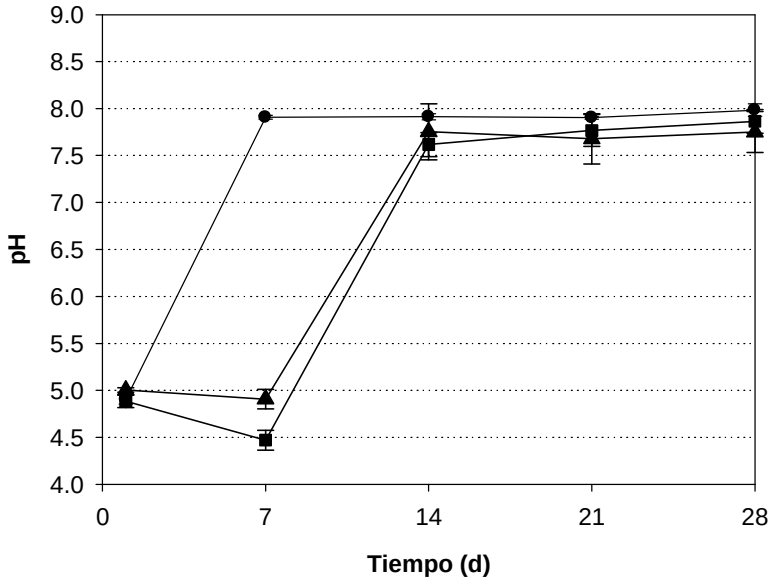

Figura 5.7. Evolución del pH en cultivos con suelo en fase *slurry* en suelo no estéril con *A. discolor* (■), *B. adusta* (▲) y suelo control (sin hongo) (●)

En el suelo natural existe una gran cantidad y variedad de microorganismos saprófitos. La introducción de hongos de putrefacción blanca requiere un efectivo crecimiento para competir con estas poblaciones autóctonas, de esta forma los hongos pueden ser capaces de secretar enzimas necesarias al medio y actuar directamente sobre el compuesto contaminante (Canet *et al.*, 2001). Una estrategia para mantener los hongos de pudrición blanca en el suelo para la biorremediación, es mediante el crecimiento sobre un material lignocelulósico, donde el substrato es impregnado con el micelio y mezclado con el suelo (Lestan y Lamar, 1996). Sin embargo, este proceso ha sido estudiado en estado sólido, donde la agitación no es un factor influyente en el proceso de biorremediación.

Así mismo, se ha demostrado que el aumento del crecimiento fúngico en un substrato lignocelulósico, también puede ser afectado por el efecto competitivo de los microorganismos autóctonos del suelo, inhibiendo la descomposición lignocelulósica fúngica y reduciendo la liberación de enzimas (Lang *et al.*, 1998), ya que muchas poblaciones de bacterias se ha comprobado que tienen una influencia indirecta en la descomposición de materiales lignocelulósico afectando la permeabilidad y atacando la estructura de la madera (Clausen, 1996).

5.3.5 Identificación de productos de degradación

Los principales productos derivados de la degradación de PCF en suelo estéril en fase *slurry* por *A. discolor* fueron identificados como se muestra en el cromatograma (Figura 5.8).

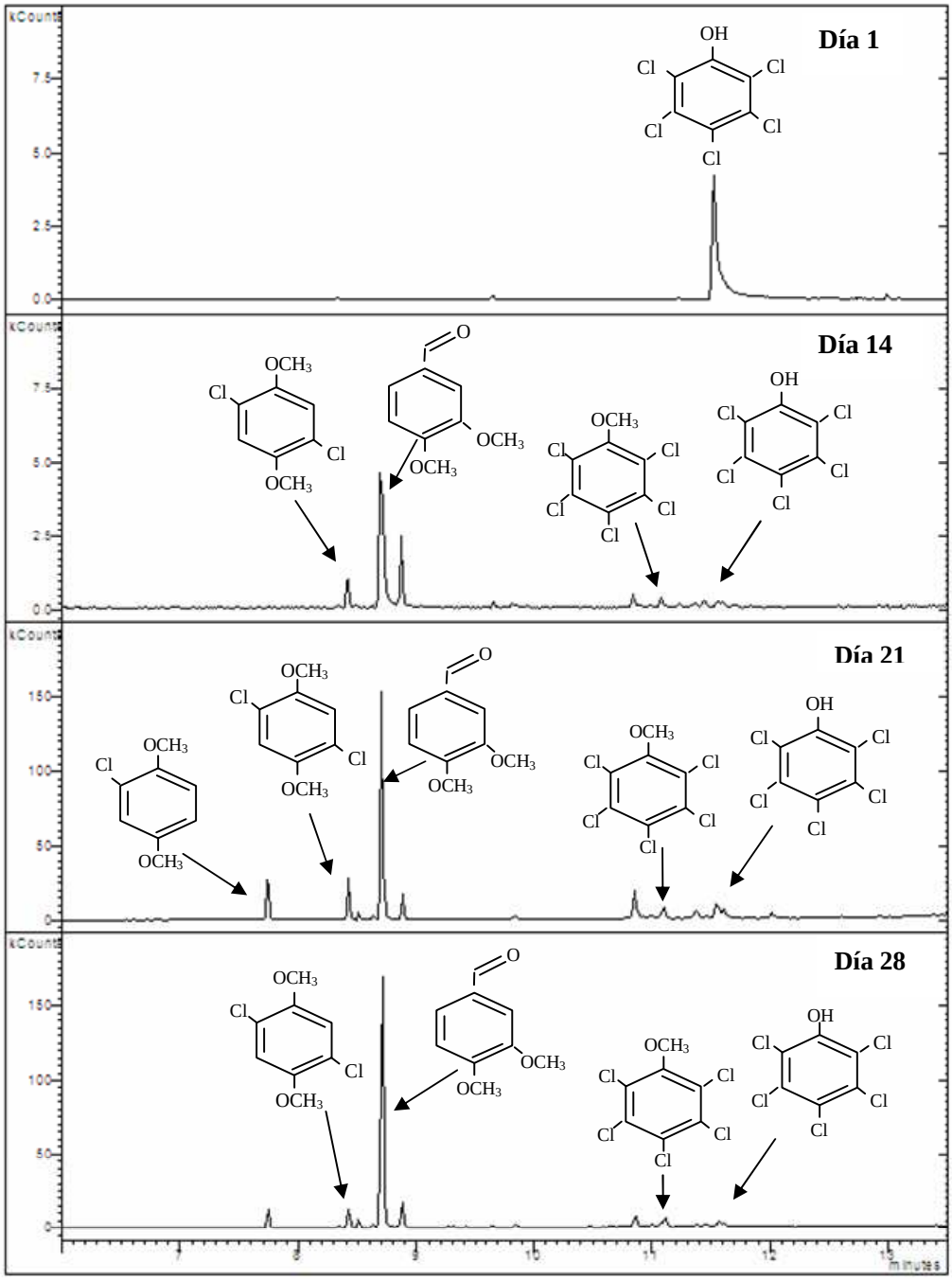

Figura 5.8. Cromatograma de la degradación de PCF (250 mg/kg) y la formación de subproductos por *A. discolor* en cultivos con suelo en fase *slurry*

En la Tabla 5.5 se presentan las principales señales de los metabolitos intermedios identificados por GC/MS.

Tabla 5.5. Productos de degradación de PCF en suelo en cultivos con suelo en fase *slurry* por *A. discolor* identificados en GC/MS

Metabolito	Principales señales de iones m/z (abundancia)	% Ocurrencia
Pentacloroanisol	265(4721), 267(3243), 263(2950), 280(2734), 135(2329), 282(1796)	95
2,5-dicloro-1,4-dimetoxibenceno	191(946), 193(683), 163(346), 206(342), 208(283)	92
2-cloro-1,4-dimetoxibenceno	157(26852), 172(14566), 129(9709), 159(9450)	62
3,4-dimetoxibenzaldehído	165(168596), 166(151365), 167(40625), 95(27925)	67

La principal reacción generada en el proceso degradación, es la metilación del PCF, donde el grupo hidroxilo (-OH) es reemplazados por grupos metoxi (-OCH_3). Esta reacción se ha señalado que es un mecanismo de detoxificación frente a compuestos orgánicos recalcitrantes.

Con los productos de degradación obtenidos se sugiere la siguiente vía de degradación, presentada en la Figura 5.9. La vía de degradación se inicia con una primera reacción de metilación con la consecuente formación de pentacloroanisol. La segunda reacción propuesta es una hidroxilación con la formación de tetraclorohidroquina (TCHQ), la que posteriormente es metilada para la generación de tetracloro-1,4-dimethoxibenceno, seguida por sucesivas reacciones de decloración hasta la formación de 2,5-dicloro-1,4-dimetoxibenceno y 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno, respectivamente. Finalmente, luego de una reacción de decloración se realizan una serie de reacciones de demetoxilación, carboxilación, reducción y metilación para la formación de 3,4-dimetoxibenzaldehído (veratraldehído) hasta la completa degradación de PCF

con la generación de CO_2 (Figura 5.9). Resultados similares obtuvo Reddy y Gold (2000) en la degradación de PCF en medio líquido por *P. chrysosporium*.

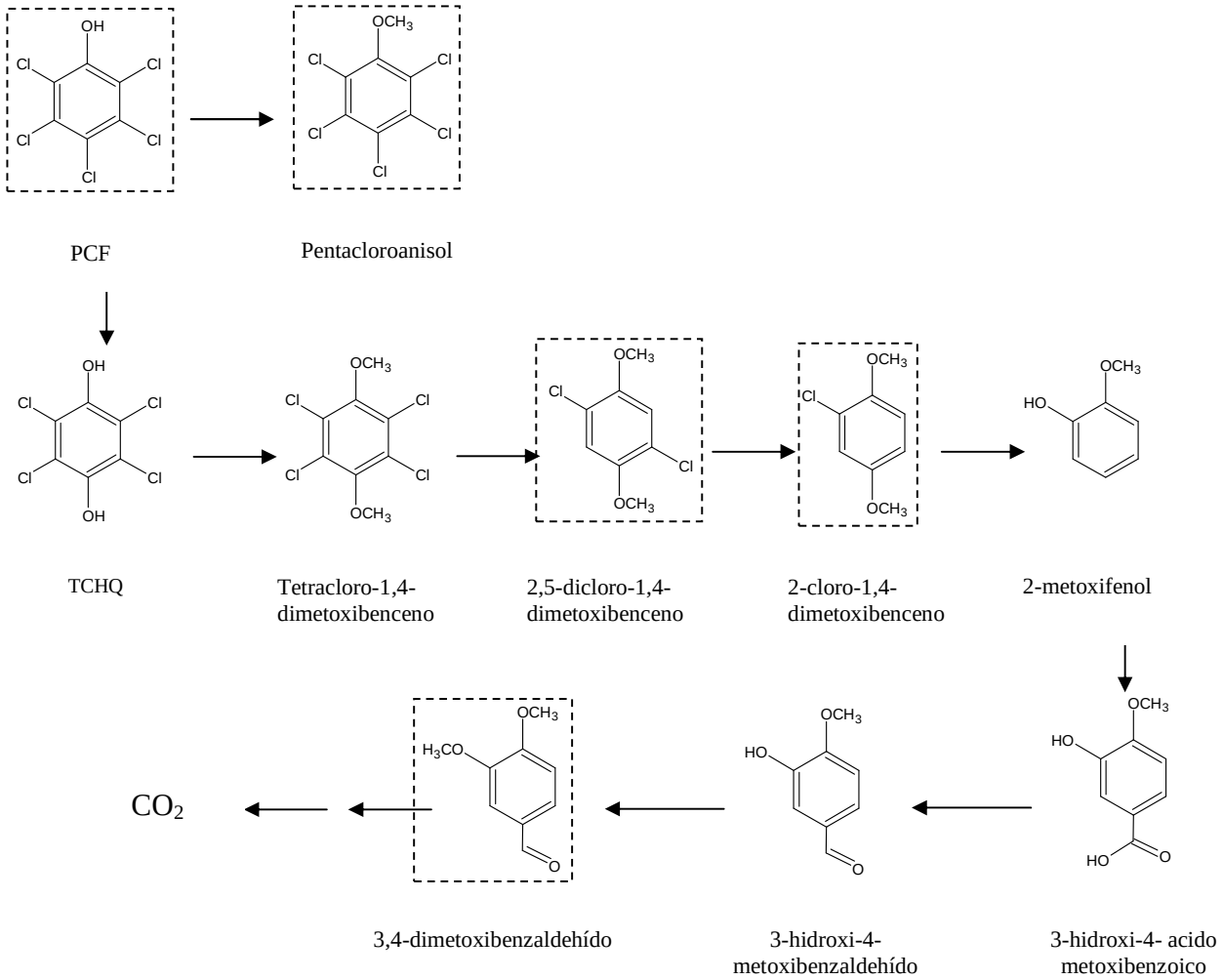

Figura 5.9. Vía propuesta para la degradación para PCF en suelo en fase *slurry* por *Anthracophyllum discolor.* Compuestos destacados corresponden a los identificados por GC-MS

Uno de los productos más ampliamente identificado durante la degradación de PCF, es el pentacloroanisol (PCA), del cual se ha demostrado que es menos tóxico que el PCF para los hongos de pudrición blanca (Lamar y Dietrich, 1992). Sin embargo, la metilación de compuestos

fenólicos clorados incrementa su lipofilicidad y su tendencia a bioacumularse (Valo y Salkinoja-Salonen, 1986).

Por lo tanto, comparando los productos obtenidos de la degradación de PCF por *A. discolor* en cultivos con suelo en fase *slurry* y considerando la vía de degradación propuesta con lo previamente reportado por otros investigadores, es posible concluir que tanto en medio líquido como en cultivo con suelo en fase *slurry*, los hongos de pudrición blanca, siguen una vía similar para la degradación de PCF, sin ser afectados por la concentración de sólidos en cultivos con suelo en fase *slurry* (100 g de suelo/L)

5.3.6 Remoción de PCF por *Anthracophyllum discolor* en reactor con suelo en fase *slurry* operado en modo *batch*

Se realizó la degradación de PCF por *A. discolor*, en un reactor de tanque agitado a escala banco de 5L con suelo en fase *slurry*, de modo de escalar el ensayo anterior y demostrar que la agitación (250 rpm) junto con el efecto de sólidos en suspensión (50 g de suelo/L) en este tipo de sistema, no es un factor de estrés para la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca. En este contexto, Valentín *et al.* (2007), demostraron previamente que *B. adusta* fue capaz de crecer y degradar cuatro hidrocarburos políciclicos aromáticos (PAHs) en un reactor con suelo *slurry*, similar al utilizado en el presente trabajo y con las mismas condiciones de operación (pH, temperatura, velocidad de agitación y aireación).

El proceso de remoción fue realizado con suelo estéril y con una concentración inicial de PCF de aproximadamente 250 mg/kg. Los resultados son mostrados en la Figura 5.11. Después de 14 y 28 días se removió 142 y 185 mg/kg, correspondiente a un 62 y 81%, respectivamente. Estos resultados son similares a los observados con *A. discolor* durante los experimentos realizados en matraces a la misma concentración (Figura 5.2b).

Durante un cultivo típico de hongos de pudrición blanca en un reactor de tanque agitado para la producción de enzimas ligninolíticas, el tiempo necesario para el consumo total de 10 g/L de glucosa es de entre 5 y 7 días. En el caso de un cultivo con suelo en fase *slurry* para *B. adusta*, el periodo fue de 11 días (Valentin *et al.*, 2007), debido principalmente al estrés mecánico impuesto por la mantención de la fase *slurry*. En el caso del cultivo con suelo en fase *slurry* con *A. discolor*

el tiempo requerido para el consumo total de glucosa fue de 9 días, lo que es cercano a lo reportado por *B. adusta.*

Por otra parte, el pH en el medio aumentó de 4,5 a 5,5 al final de la incubación (Figura 5.10). El monitoreo de este parámetro es importante, por que a valores de pH superiores a 7,4 puede inactivar la actividad MnP de hongos de pudrición blanca (Lu-Chau *et al.*, 2004).

Para confirmar la viabilidad y capacidad ligninolítica del hongo en el reactor, se inocularon muestras en placas de agar con Poly R-478 bajo condiciones estériles. Se observó la típica actividad de hongos de pudrición blanca, con un cambio de color de rojo a amarillo, lo cual indica que el sistema ligninolítico durante los 21 días estuvo activo (Figura 5.11). Sin embargo, al día 28 se mostró una inactividad del sistema ligninolítico.

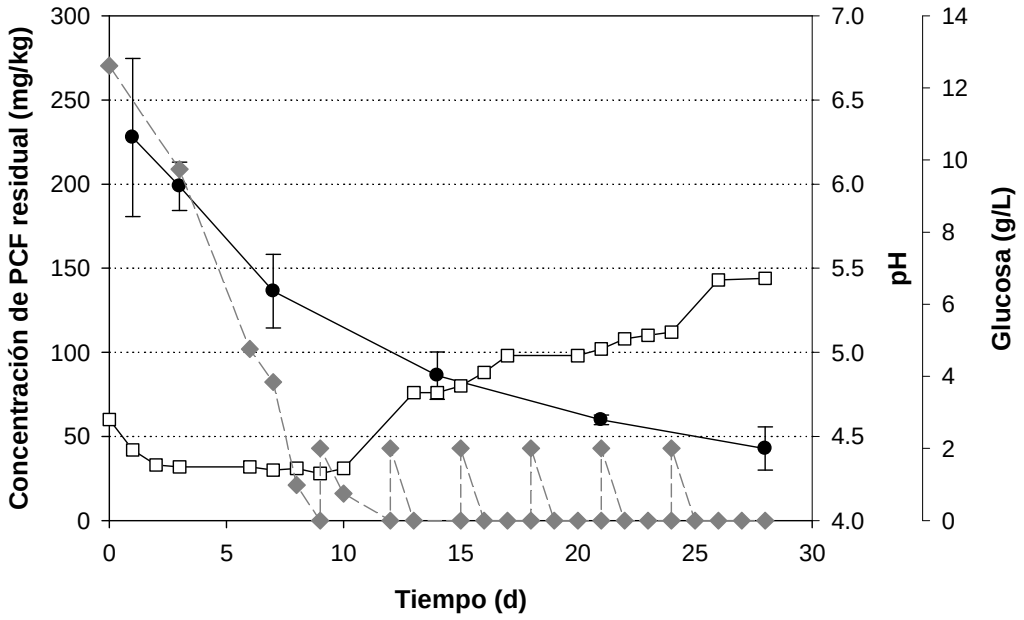

Figura 5.10. Concentración residual de PCF (●), evolución del pH (□) y concentración de glucosa (♦) en reactor con suelo en fase *slurry* inoculado con *Anthracophyllum discolor*

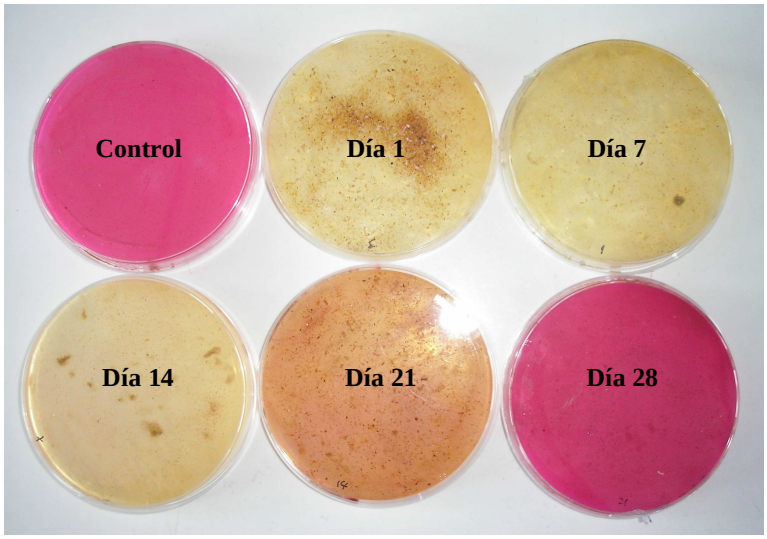

Figura 5.11. Decoloración de Poly-478 por *Anthracophyllum discolor* cultivado en reactor con suelo en fase *slurry* con PCF

En la Figura 5.12 se muestra el crecimiento de la biomasa durante 11 días de incubación. Se observó un rápido crecimiento de la biomasa fúngica (micelio) (día 1), con la formación de pellet (día 6). La principal diferencia entre el pellet obtenido en el reactor con suelo en fase *slurry* y pellet de cultivos convencionales, es el color oscuro. Esta diferencia sugiere que el hongo es capaz de utilizar el suelo como soporte para comenzar la formación de pellet. Resultados similares son mostrados por Valentín *et al.* (2007) con *Bjerkandera adusta* en reactor *slurry* para la degradación de PAHs.

Por otra parte, se observó que los pellets comienzan a romperse (día 11) para nuevamente formarse micelio, similares a los presentados al día 1 (Figura 5.12), debido probablemente a la baja concentración de glucosa y nitrógeno en el medio. Sin embargo, la capacidad degradativa se mantiene por todo el transcurso del ensayo, por lo que las condiciones de agitación (250 rpm) y sólidos (50 g suelo/L) en el interior del reactor no impidieron el crecimiento del hongo.

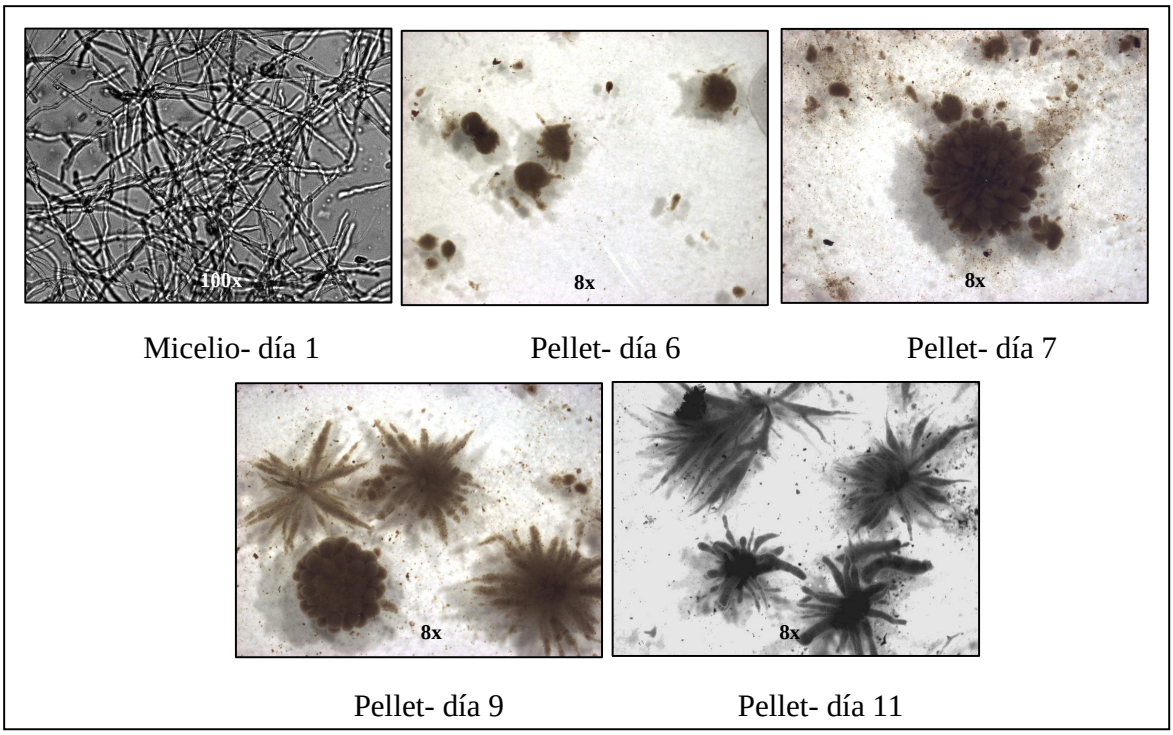

Figura 5.12. Formación de pellet de *Anthracophyllum discolor* en reactor con suelo en fase *slurry*

Finalmente, la más importante diferencia observada entre los cultivos realizados en matraces y en el reactor fueron los niveles de la actividad MnP. Una baja actividad MnP de 15 U/L fue detectada sólo al inicio del proceso en el reactor (día 1). La baja producción enzimática puede ser asociada a las condiciones de estrés que genera el reactor con suelo en fase *slurry* sobre el hongo. Diversos estudios (Bonnarme y Jeffries, 1990, Venkatadri y Irvine, 1990) han demostrado que el estrés por agitación puede ser perjudicial para la producción de enzimas ligninolíticas. Por lo tanto, los resultados de actividad MnP confirman a los obtenidos en las fermentaciones realizadas en matraces, en donde no se encontró una relación entre la remoción de PCF y los niveles de actividad MnP. Esto sugiere, que otro sistema enzimático puede actuar durante la remoción de PCF en un sistema con suelo en fase *slurry*.

5.5 CONCLUSIONES

La utilización de hongos de pudrición blanca en la degradación de PCF en suelo en fase *slurry* es una buena alternativa para biorremediar sitios contaminados, principalmente por la rápida degradación del contaminante, producto de la agitación lo que permite una mayor biodisponibilidad de éste a la acción de los hongos. Así mismo, las especies fúngicas utilizadas varían en su capacidad de degradación, siendo *A. discolor* la cepa que presentó un mayor potencial para la biorremediación de suelos contaminados con PCF.

La aplicación de nutrientes fue importante para obtener una rápida degradación, de lo cual el DDGS como fuente de carbono y nitrógeno incrementó la actividad enzimática y la capacidad degradativa de ambas cepas fúngicas utilizadas. Sin embargo, no se encontró correlación entre la actividad MnP y la degradación de PCF, tanto en los ensayos realizados en matraces como en el biorreactor. Esto sugiere que otras enzimas intracelulares o extracelulares diferentes del sistema enzimático ligninolítico de hongos de pudrición blanca, pueden actuar en la degradación de PCF del suelo.

Se identificaron productos intermedios al proceso degradativo, típicos de la vía degradativa de PCF, por lo que el proceso no fue afectado por la concentración de sólidos y la agitación en un sistema con suelo en fase *slurry*.

Finalmente, de los resultados obtenidos de la degradación de PCF con suelo en fase *slurry* estéril y no estéril, se concluye que la microflora autóctona del suelo ejerce un efecto competitivo sobre los hongos de pudrición blanca, disminuyendo la degradación de PCF.

CAPÍTULO 6

DISCUSIONES GENERALES

Actualmente, la contaminación de suelos es uno de los principales problemas ambientales, debido principalmente a la persistencia de los contaminantes en este ambiente, por lo que existe una gran necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para su remediación (Boopathy, 2000). La aplicación de tecnología con hongos de pudrición blanca ha sido unas de las más atractivas, ya que permite la degradación completa de los contaminantes (Lamar y Dietrich, 1990, Lamar *et al.*, 1990, Tuomela *et al.*, 1999, Maloney, 2001, Bollag *et al.*, 2003, Valentin *et al.*, 2007). En este sentido, el hongo más estudiado ha sido *P. chrysosporium*, debido a su elevada producción de enzimas ligninolítica y alta capacidad de degradar compuestos orgánicos persistentes (Mileski *et al.*, 1988, Choi *et al.*, 2000, Chagas y Durrant, 2001).

En el *screening* realizado a hongos de pudrición blanca provenientes de bosques de la región de La Araucanía de Chile, se obtuvo que *Stereum hirsutum*, *Inonotus* sp. y *Anthracophyllum discolor*, demostraron tener un mayor potencial ligninolítico que *P. chrysosporium*. Este potencial está dado por la producción enzimática ligninolítica, que para todas las cepas fue dependiente de las condiciones de cultivo, siendo mayor cuando se utilizó glucosa (10 g/L) como fuente de carbono y una baja concentración de nitrógeno (0,2 g/L), con una relación carbono/nitrógeno igual a 120. El efecto que provoca una alta relación C/N sobre la producción enzimática ligninolítica de estos hongos, concuerda con el obtenido por diversos estudios (Dhawale *et al.*, 1992, Reddy *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2005), debido a que se asemeja a los bajos niveles de nitrógeno y altos contenidos de carbono que posee la madera (Leatham y Kirk, 1983).

La máxima producción de enzimas, principalmente de MnP y LiP, fue obtenida con el hongo *A. discolor*, para todos los medios de cultivo evaluados. La actividad enzimática ligninolítica se ha demostrado que es el principal mecanismo que utilizan estos hongos para degradar compuestos orgánicos persistentes (Reddy y Gold, 2000, Pointing, 2001, Bollag *et al.*, 2003). En esta contexto, *A. discolor* fue la cepa seleccionada y utilizada para evaluar la degradación de PCF, adicionado a un medio de cultivo, en aplicación sucesiva de 50 y 100 mg/L. La remoción de PCF por *A. discolor* fue de 90 y 40% en la primera y segunda etapa, respectivamente, correspondiente a una concentración total removida de aproximadamente 90 mg/L. Diversos estudios han

demostrado elevados porcentajes de remoción de PCF en medio líquido por diferentes hongos (Mileski *et al.*, 1988, Choi *et al.*, 2002, Walter *et al.*, 2004), con valores similares a los detectados por *A. discolor*. Por lo tanto, es posible considerarlo como un hongo con elevada capacidad degradativa, incluso mayor a la obtenida por *P. chrysosporium.*

Así mismo, se determinó que el PCF, además de ser degradado o transformado por las enzimas ligninolíticas, puede ser también removido o degradado por otros sistemas enzimáticos intracelulares o bien por procesos físico-químicos (Reddy *et al.*, 1998, Hammel *et al.*, 2002, Matsuzaki y Wariishi, 2004, Cea, 2006), debido a que no se encontró una relación directa entre la remoción de PCF y la producción de enzimas, principalmente cuando se adicionó 100 mg/L de PCF. Lo anterior sugiere que las enzimas ligninolíticas tienen una participación fundamental en la primera etapa de la degradación del contaminante, la cual es seguida por la acción de otros mecanismos que intervienen en conjunto en la remoción de PCF.

Considerando la elevada capacidad degradativa que posee *A. discolor* para degradar PCF en medio líquido, es posible que éste sea utilizado en procesos de biorremediación de suelos contaminados. Sin embargo, en el suelo existen una serie de variables las cuales pueden afectar el metabolismo y actividad degradativa de los hongos de pudrición blanca y que por lo tanto requieren ser evaluadas. Entre estas variables se destaca principalmente: la adsorción del PCF a la fracción orgánica e inorgánica del suelo, lo que va a condicionar la biodisponibilidad del contaminante (Lamar y Dietrich, 1990, Bengtsson *et al.*, 1993, Diez *et al.*, 1999, McGrath y Singleton, 2000, Cea, 2006), la microflora autóctona del suelo que puede ejercer un efecto antagónico o sinérgico sobre el hongo de pudrición blanca (Radtke *et al.*, 1994, Kotterman *et al.*, 1998, Reddy y Mathew, 2001) y las características físico-químicas del suelo, tales como pH, contenido de materia orgánica del suelo, entre otras, que también puede afectar el metabolismo y la capacidad degradativa del hongo (Okeke *et al.*, 1996).

La biorremediación de suelos contaminados con diferentes concentraciones de PCF, se realizó mediante la aplicación de dos tecnologías *batch*: con suelo en estado sólido y con suelo en fase *slurry*. En el proceso de biorremediación de suelo en estado sólido, se utilizó como cepa control para efectos comparativos *P. chrysosporium,* ya que ha sido ampliamente estudiada en este sistema (Lamar y Dietrich, 1990, Lamar *et al.*, 1990, McGrath y Singleton, 2000), mientras que para el proceso de biorremediación con suelo en fase *slurry* se utilizó como control la cepa

Bjerkandera adusta, ya que previamente fue evaluada por Valentín *et al.* (2007), en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en un biorreactor con suelo en fase *slurry*, obteniendo una elevada remoción del contaminante y un efectivo crecimiento en el sistema.

En el sistema con suelo en estado sólido a los 28 días de incubación, la remoción por adsorción del contaminante fue del 75%, mientras que en sistema con suelo en fase *slurry*, la remoción por adsorción de PCF fue superior al 90% en todas las concentraciones de PCF evaluadas (100, 250 y 350 mg/kg). En este último caso, la biodisponibilidad del contaminante fue favorecida por la agitación y mezcla del suelo en fase líquida, lo que permite una mayor transferencia de masa (Dean-Ross, 2005, Quintero *et al.*, 2005, Mohan *et al.*, 2006, Quintero *et al.*, 2006).

Por otra parte, se evaluó el efecto de la aplicación de un material lignocelulósico como fuente de carbono y nitrógeno, de modo de favorecer el crecimiento de los hongos en el suelo. Se han utilizado diversos materiales lignocelulósicos como substrato para hongos de pudrición blanca, entre ellos el más utilizado es la paja de trigo (Dorado *et al.*, 1999, Hofrichter *et al.*, 1999, Lechner y Papinutti, 2006). En este estudio se evaluó el crecimiento de *A. discolor* sobre: paja de trigo, grano de trigo y viruta de madera. El mayor crecimiento del hongo fue obtenido en el grano de trigo, principalmente por que este material posee hidratos de carbono y almidón, los que estimularían el crecimiento del hongo, por lo que fue utilizado en el proceso de biorremediación de PCF en estado sólido. En el tratamiento con suelo en fase *slurry* se utilizó un residuo lignocelulósico, generado como subproducto de una planta de etanol conocido como granos secos de destilería con solubles (DDGS), el cual se obtiene mediante secado de los residuos del proceso de obtención de etanol como biocombustible, a partir de diversos ingredientes ricos en almidón. Este último material, posee un importante aspecto económico, el cual es un co-producto de un proceso productivo, el que generalmente se utiliza para la alimentación de animales y es de bajo costo, en comparación con la preparación de un medio sintético (glucosa/tartrato de amonio).

En la biorremediación de suelo en fase sólida, se observó un efecto sinérgico entre los microorganismos del suelo y los hongos *A. discolor* y *P. chrysosporium*, obteniéndose elevados valores de remoción de PCF (70-85%). Por otro lado, el proceso con suelo en fase *slurry*, se observó un efecto antagónico entre la microflora autóctona del suelo y los hongos inoculados, disminuyendo la capacidad degradativa de *A. discolor* y *B. adusta*. En este caso, se obtuvo un

50% de remoción, atribuido a los microorganismos del suelo, en comparación al suelo estéril inoculado con los hongos, donde se obtuvieron elevados valores de remoción (>90%).

Las diferencias obtenidas entre los dos sistemas de biorremediación se deben fundamentalmente a que en el suelo en fase *slurry* la agitación, que aunque favorece la biodisponibilidad del contaminante, impide la colonización de los hongos en el material lignocelulósico. Por lo tanto, el crecimiento de los hongos en un material lignocelulósico puede favorecer el crecimiento de los hongos y en cierto modo disminuir el efecto competitivo que puede provocar la microflora autóctona del suelo y así aumentar la degradación de los contaminantes. A pesar del efecto de la agitación en el sistema *slurry*, se verificó la degradación del PCF a través de la identificación por GC-MS de los productos típicos de la vía metabólica.

Finalmente, se evaluó la capacidad degradativa de PCF de *A. discolor* en dos suelos (Umbrisol y Andisol) con características físico-químicas diferentes, principalmente pH y contenido de materia orgánica. El pH fue uno de los factores más importante en la biodisponibilidad de PCF, disminuyendo en suelos ácidos, asociado principalmente a efecto de adsorción. Así mismo, en suelos con pH ácidos la capacidad degradativa de *A. discolor* fue afectada negativamente, debido probablemente a la microflora autóctona de estos suelos (Umbrisol), la que provocó un efecto competitivo con los hongos de pudrición blanca (Wardle, 1992). Por otro lado, la mayor degradación del PCF por efecto del *A. discolor* fue obtenida en el Andisol, en el cual se observó una menor remoción por adsorción de este contaminante.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en este estudio entregan conocimientos sobre la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca aislados de bosques de la región de La Araucanía, entre los cuales *Anthracophyllum discolor* demostró ser el más adecuado para ser utilizado en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con pentaclorofenol.

En base a los resultados obtenidos se plantean las siguientes conclusiones generales:

- En el *screening* realizado a hongos de pudrición blanca provenientes de bosques de la región de La Araucanía de Chile, se obtuvo que *Stereum hirsutum*, *Inonotus* sp. y *Anthracophyllum discolor*, tenían un elevado potencial ligninolítico, bajo las condiciones de cultivo evaluadas.
- La producción de las enzimas ligninolíticas por hongos de pudrición blanca seleccionados, fue dependiente de la concentración de nitrógeno, siendo mayor la producción enzimática en el medio líquido con menor concentración de nitrógeno (0,2 g/L). La fuente de carbono también afectó la producción de las enzimas, siendo mayor en el medio que contenía glucosa como fuente de carbono. De los 3 hongos estudiados, *A. discolor* fue la cepa con mayor producción ligninolítica, incluso mayor que la del hongo control *P. chrysosporium.*
- La cepa con mayor capacidad para remover PCF en medio líquido fue *A. discolor*. Sin embargo, su actividad ligninolítica fue fuertemente afectada cuando se duplicó la adición del contaminante, evidenciándose la presencia de otros sistemas enzimáticos actuando sobre el PCF.
- En reactor con suelo en fase *slurry* inoculado con *A. discolor* se obtuvo elevados porcentajes de remoción de PCF (90%), producto de una elevada transferencia de masa, por efecto de la agitación y mezcla del suelo en este tipo de reactor. No así en el suelo en fase sólida, donde se obtuvo una baja disponibilidad del contaminante, producto de la elevada adsorción del PCF en el suelo.
- Durante la remoción de PCF en suelo en fase *slurry* por *A. discolor* se identificaron productos intermedios típicos del proceso degradativo de PCF, los que pueden ser susceptibles de ser mineralizados completamente hasta CO_2 y H_2O.

- En el tratamiento de degradación de PCF con suelo en fase *slurry*, la agitación y mezcla impide la colonización del hongo en el material lignocelulósico y la microflora del suelo ejerce un efecto inhibitorio sobre *A. discolor*, mientras que en el tratamiento con suelo en fase sólida por *A. discolor*, la colonización del hongo en material lignocelulósico generera un efecto sinérgico entre la microflora autóctona del suelo y el hongo, favoreciendo la remoción de PCF.

8. PROYECCIONES

Si bien se logró seleccionar un hongo de pudrición blanca con elevada capacidad para remover y degradar PCF de suelos contaminados, el proceso degradativo sólo fue estudiado en laboratorio a pequeña escala, bajo condiciones controladas. En condiciones de campo los resultados obtenidos en esta investigación podrían ser diferentes, ya que existe la presencia de diversos factores ambientales, tales como, bajas temperaturas, sequías, lluvias excesivas, entre otras, las que podrían afectar negativamente la degradación de un contaminante por la acción de hongos de pudrición blanca. Por otra parte, la exposición del contaminante en condiciones de campo, puede afectar el proceso de biorremediación, debido a que en el suelo los químicos no son distribuidos uniformemente, afectando su biodisponibilidad y la adsorción del contaminante en el suelo. Al respecto, existen muy pocos estudios que abordan el efecto de estos factores en su conjunto sobre la capacidad degradativa de estos hongos. Es por esto, que se hace necesario investigaciones adicionales para determinar la viabilidad de utilizar estos hongos a una mayor escala que incluya el efecto de condiciones ambientales reales y posteriormente realizar el experimento *in situ*.

Otro aspecto interesante a estudiar, son las poblaciones microbianas del suelo, ya que en esta investigación se determinó que los microorganismos del suelo poseían capacidad para degradar PCF, las cuales fueron estimulados con la aplicación de granos de trigo como material lignocelulósico y que además ejercían un efecto sinérgico con los hongos de pudrición blanca evaluados. Por lo que se hace necesario evaluar el efecto de estos tratamientos sobre las poblaciones microbianas del suelo utilizando técnicas moleculares para aislar e identificar las principales poblaciones involucradas en el proceso degradativo, las que podrían ser aplicadas en conjunto con hongos para biorremediar sitios contaminados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aktas, N., and A. Tanyolac. 2003. Kinetics of laccase catalyzed oxidative polymerization of catechol. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic **22**:61-69.

Alleman, B. C., B. E. Logan, and R. L. Gilbertson. 1992. Toxicity of pentachlorophenol to 6 species of white rot fungi as a function of chemical dose. Applied and Environmental Microbiology **58**:4048-4050.

Altwicker, E. R. 1991. Some laboratory experimental-designs for obtaining dynamic property data on dioxins. Science of the Total Environment **104**:47-72.

Antizar-Ladislao, B., and N. I. Galil. 2003. Kinetics of biodegradation during remediation of consecutive accidental spills of chlorophenols in a sandy aquifer. Water Science and Technology **47**:157-164.

Arora, D. S., and P. K. Gill. 2005. Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*. World Journal of Microbiology & Biotechnology **21**:1021-1028.

ATSDR. 1989. Decision guide for identifying substance-specific data needs related to toxicological profiles; Notice. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Federal Register **54**:37617-37634.

ATSDR. 2001. Toxicological profile for pentachlorophenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Giorgia. USA.

Aust, S. D., and J. T. Benson. 1993. The fungus among us - use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. Environmental Health Perspectives **101**:232-233.

Balba, M. T., N. Al-Awadhi, and R. Al-Daher. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: Microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. Journal of Microbiological Methods **32**:155-164.

Barbeau, C., L. Deschenes, D. Karamanev, Y. Comeau, and R. Samson. 1997. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. Applied Microbiology and Biotechnology **48**:745-752.

Barr, D. P., and S. D. Aust. 1994. Pollutant degradation by white-rot fungi. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology **138**:49-72.

Bass, D. H., N. A. Hastings, and R. A. Brown. 2000. Performance of air sparging systems: a review of case studies. Journal of Hazardous Materials **72**:101-119.

Bengtsson, G., R. Lindqvist, and M. D. Piwoni. 1993. Sorption of trace organics to colloidal clays, polymers, and bacteria. Soil Science Society of America Journal **57**:1261-1270.

Benoit, P., E. Barriuso, S. Houot, and R. Calvet. 1996. Influence of the nature of soil organic matter on the sorption-desorption of 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). European Journal of Soil Science **47**:567-578.

Bollag, J. M., H. L. Chu, M. A. Rao, and L. Gianfreda. 2003. Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. Journal of Environmental Quality **32**:63-69.

Bollag, J. M., C. J. Myers, and R. D. Minard. 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic-matter. Science of the Total Environment **123**:205-217.

Bonnarme, P., and T. W. Jeffries. 1990. Selective production of extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* in an airlift bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering **70**:158-163.

Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology **74**:63-67.

Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1988. Oxidative enzymes from the lignin degrading fungus *Pleurotus-Sajor-Caju*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society **195**.

Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1990. Substrate range of veratryl alcohol oxidase and phenol oxidase from white-rot fungi. Abstracts of Papers of the American Chemical Society **199**:38-Cell.

Bourbonnais, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Applied and Environmental Microbiology **61**:1876-1880.

Boyle, D. 2006. Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungi. Journal of Environmental Management **80**:380-386.

Braun, W. H., J. D. Young, G. E. Blau, and P. J. Ghering. 1977. The pharmacokinetics and metabolism of pentachlorophenol in rats. Toxicology and Applied Pharmacology **41**:395.

Bumpus, J. A., and M. Tatarko. 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* - identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases. Current Microbiology **28**:185-190.

Buswell, J. A., Y. J. Cai, and S. T. Chang. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. Fems Microbiology Letters **128**:81-87.

Buyuksonmez, F., R. Rynk, T. F. Hess, and E. Bechinski. 1999. Occurrence, degradation and fate of pesticides during composting - Part I: Composting, pesticides, and pesticide degradation. Compost Science & Utilization **7**:66-82.

Calvo, A. M., J. L. Copa-Patino, O. Alonso, and A. E. Gonzalez. 1998. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. Archives of Microbiology **171**:31-36.

Canet, R., J. G. Birnstingl, D. G. Malcolm, J. M. Lopez-Real, and A. J. Beck. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. Bioresource Technology **76**:113-117.

Caramelo, L., M. J. Martinez, and A. T. Martinez. 1999. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. Applied and Environmental Microbiology **65**:916-922.

Castillo, I., and C. Bárcenas. 1998. Pentaclorofenol: toxicología y riesgo para el ambiente. Madera y Bosques **4**:21-37.

Cea, M. 2006. Mecanismos físico-químicos involucrados en la retención de compuestos orgánicos clorados en el suelo. Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. Universidad de La Frontera.

Cea, M., J. C. Seaman, A. A. Jara, M. L. Mora, and M. C. Diez. 2005. Describing chlorophenol sorption on variable-charge soil using the triple-layer model. Journal of Colloid and Interface Science **292**:171-178.

Chagas, E. P., and L. R. Durrant. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. Enzyme and Microbial Technology **29**:473-477.

Chiu, S. W., M. L. Ching, K. L. Fong, and D. Moore. 1998. Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. Mycological Research **102**:1553-1562.

Choi, S. H., S. H. Moon, and M. B. Gu. 2002. Biodegradation of chlorophenols using the cell-free culture broth of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized in polyurethane foam. Journal of Chemical Technology and Biotechnology **77**:999-1004.

Choi, S. H., S. H. Moon, J. S. Lee, and M. B. Gu. 2000. Biodegradation of 2,4,5-tichlorophenol using cell-free culture broths of *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Microbiology and Biotechnology **10**:759-763.

Clausen, C. A. 1996. Bacterial associations with decaying wood: A review. International Biodeterioration & Biodegradation **37**:101-107.

Couto, S. R., M. A. Sanroman, D. Hofer, and G. M. Gubitz. 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. Bioresource Technology **95**:67-72.

Crestini, C., A. D'Annibale, G. G. Sermanni, and R. Saladino. 2000. The reactivity of phenolic and non-phenolic residual kraft lignin model compounds with Mn(II)-peroxidase from *Lentinula edodes*. Bioorganic & Medicinal Chemistry **8**:433-438.

Cullen, D., and P. J. Kersten. 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *in* R. Brambl and G. A. Marzluf, editors. The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology.

Czaplicka, M. 2004. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. Science of the Total Environment **322**:21-39.

D'Angelo, E. M., and K. R. Reddy. 2000. Aerobic and anaerobic transformations of pentachlorophenol in wetland soils. Soil Science Society of America Journal **64**:933-943.

de Koker, T. H., J. Zhao, S. F. Allsop, and B. J. H. Janse. 2000. Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. Mycological Research **104**:820-824.

Dean-Ross, D. 2005. Biodegradation of selected PAH from sediment in bioslurry reactors. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **74**:32-39.

Dec, J., and J. M. Bollag. 1990. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **19**:543-550.

Dec, J., and J. M. Bollag. 1994. Dehalogenation of chlorinated phenols during binding to humus. Bioremediation through Rhizosphere Technology **563**:102-111.

deJong, E., A. E. Cazemier, J. A. Field, and J. A. M. Debont. 1994. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de-novo by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. Applied and Environmental Microbiology **60**:271-277.

deJong, E., and J. A. Field. 1997. Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogens by basidiomycetes. Annual Review of Microbiology **51**:375-414.

Dhawale, S. W., S. S. Dhawale, and D. Deanross. 1992. Degradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. Applied and Environmental Microbiology **58**:3000-3006.

Diez, M. C., M. L. Mora, and S. Videla. 1999. Adsorption of phenolic compounds and color from bleached Kraft mill effluent using allophanic compounds. Water Research **33**:125-130.

Diez, M. C., A. Quiroz, S. Ureta-Zanartu, G. Vidal, M. L. Mora, F. Gallardo, and R. Navia. 2005. Soil retention capacity of phenols from biologically pre-treated kraft mill wastewater. Water Air and Soil Pollution **163**:325-339.

DiVincenzo, J. P., and D. L. Sparks. 2001. Sorption of the neutral and charged forms of pentachlorophenol on soil: Evidence for different mechanisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **40**:445-450.

Domde, P., A. Kapley, and H. J. Purohit. 2007. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. Environmental Science and Pollution Research **14**:7-11.

Dorado, J., G. Almendros, S. Camarero, A. T. Martinez, T. Vares, and A. Hatakka. 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. Enzyme and Microbial Technology **25**:605-612.

Dosoretz, C. G., S. B. Dass, C. A. Reddy, and H. E. Grethlein. 1990. Protease mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **56**:3429-3434.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry **28**:350-356.

Eaton, R., and M. Hale. 1993. Wood, decay, pests and prevention. Chapman and Hall, London.

Eichlerova, I., L. Homolka, L. Lisa, and F. Nerud. 2005. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* and *Pleurotus calyptratus*. Chemosphere **60**:398-404.

Evans, C., and J. Hedger. 2001. Degradation of cell wall polymers. In Fungi in bioremediation. Gadd G. Ed Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

Feijoo, G., M. T. Moreira, R. SierraAlvarez, J. A. Field, and J. M. Lema. 1997. Kraft paste bleaching with ligninolitic fungi. Afinidad **54**:321-326.

Field, J. A., E. Dejong, G. Feijoocosta, and J. A. M. Debont. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Trends in Biotechnology **11**:44-49.

Gentry, T. J., C. Rensing, and I. L. Pepper. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology **34**:447-494.

Gianfreda, L., and J. M. Bollag. 2002. Isolated enzyme for the transformation and detoxification of organic pollutants, Marcel Dekker edition, New York.

Gianfreda, L., F. Sannino, M. T. Filazzola, and A. Leonowicz. 1998. Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain Cerrena unicolor. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic **4**:13-23.

Gianfreda, L., F. Xu, and J. M. Bollag. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremed. J. **3**.

Gold, M. H., and M. Alic. 1993. Molecular-biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiological Reviews **57**:605-622.

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

Gough, M. 1991. Human health-effects - what the data indicate. Science of the Total Environment **104**:129-158.

Grabski, A. C., H. J. Grimek, and R. R. Burgess. 1998. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocalalytic generation of Mn-III-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. Biotechnology and Bioengineering **60**:204-215.

Hallberg, B. M., G. Henriksson, G. Pettersson, A. Vasella, and C. Divne. 2003. Mechanism of the reductive half-reaction in cellobiose dehydrogenase. Journal of Biological Chemistry **278**:7160-7166.

Hammel, K. E. 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. New Journal of Chemistry **20**:195-198.

Hammel, K. E., A. N. Kapich, K. A. Jensen, and Z. C. Ryan. 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme and Microbial Technology **30**:445-453.

Harmsen, J. 1991. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. On-site bioremediation: Processes for xenobiotic and hidrocarbon tratment. Hinchee, R.E. and Offenbuttel, R.E. (Eds.). Boston.

Hatzinger, P. B., and M. Alexander. 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environmental Science & Technology **29**:537-545.

Heinfling, A., M. J. Martinez, A. T. Martinez, M. Bergbauer, and U. Szewzyk. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. Applied and Environmental Microbiology **64**:2788-2793.

Hofrichter, M., and W. Fritsche. 1996. Depolymerization of low rank coal by extracellular fungal enzyme systems .1. Screening for low rank-coal-depolymerizing activities. Applied Microbiology and Biotechnology **46**:220-225.

Hofrichter, M., K. Scheibner, F. Bublitz, I. Schneegass, D. Ziegenhagen, R. Martens, and W. Fritsche. 1999. Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide. Holzforschung **53**:161-166.

Hohener, P., D. Hunkeler, A. Hess, T. Bregnard, and J. Zeyer. 1998. Methodology for the evaluation of engineered in situ bioremediation: lessons from a case study. Journal of Microbiological Methods **32**:179-192.

Hutzler, N. J., C. R. Baillod, and P. A. Schaepe. 1989. Biological reclamation of soil contaminated with pentachlorophenol. The Hazardous Material Control Research **23**:361-365.

Janik, F., and H. U. Wolf. 1992. The Ca^{2+}-Transport atpase of human erythrocytes as an invitro toxicity test system - acute effects of some chlorinated compounds. Journal of Applied Toxicology **12**:351-358.

Jiang, X. Y., G. M. Zeng, D. L. Huang, Y. Chen, F. Liu, G. H. Huang, J. B. Lil, B. D. Xi, and H. L. Liu. 2006. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. World Journal of Microbiology & Biotechnology **22**:909-913.

Jung, H. G., F. R. Valdez, A. R. Abad, R. A. Blanchette, and R. D. Hatfield. 1992. Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and invitro digestibility of oat straw and alfalfa stems. Journal of Animal Science **70**:1928-1935.

Kamitsuji, H., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied Microbiology and Biotechnology **65**:287-294.

Kapich, A. N., B. A. Prior, A. Botha, S. Galkin, T. Lundell, and A. Hatakka. 2004. Effect of lignocellulose containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. Enzyme and Microbial Technology **34**:187-195.

Kirby, N., R. Marchant, and G. McMullan. 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. Fems Microbiology Letters **188**:93-96.

Kirk, T. K., and R. L. Farrel. 1987. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignine. Annual Review and Microbiology **41**:465-505.

Kogevinas, M., H. Becher, T. Benn, P. A. Bertazzi, P. Boffetta, H. B. BuenodeMesquita, D. Coggon, D. Colin, D. FleschJanys, M. Fingerhut, L. Green, T. Kauppinen, M. Littorin, E. Lynge, J. D. Mathews, M. Neuberger, N. Pearce, and R. Saracci. 1997. Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins - An expanded and updated international cohort study. American Journal of Epidemiology **145**:1061-1075.

Kohring, G. W., X. M. Zhang, and J. Wiegel. 1989. Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in fresh water sediments in the presence of sulfate. Applied and Environmental Microbiology **55**:2735-2737.

Kotterman, M. J. J., E. H. Vis, and J. A. Field. 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. Applied and Environmental Microbiology **64**:2853-2858.

Kuan, I. C., and M. Tien. 1993. Stimulation of Mn-peroxidase activity - a possible role for oxalate in lignin biodegradation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**:1242-1246.

Lamar, R. T., and D. M. Dietrich. 1990. Insitu depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* Spp. Applied and Environmental Microbiology **56**:3093-3100.

Lamar, R. T., and D. M. Dietrich. 1992. Use of lignin degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol treated wood. Journal of Industrial Microbiology **9**:181-191.

Lamar, R. T., M. J. Larsen, and T. K. Kirk. 1990. Sensitivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. Applied and Environmental Microbiology **56**:3519-3526.

Lang, E., A. Gonser, and F. Zadrazil. 2000. Influence of incubation temperature on activity of ligninolytic enzymes in sterile soil by *Pleurotus* sp and *Dichomitus squalens*. Journal of Basic Microbiology **40**:33-39.

Lang, E., F. Nerud, and F. Zadrazil. 1998. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. Fems Microbiology Letters **167**:239-244.

Leatham, G. F., and T. K. Kirk. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white rot basidiomycetes. Fems Microbiology Letters **16**:65-67.

Lechner, B. E., and V. L. Papinutti. 2006. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. Process Biochemistry **41**:594-598.

Leontievsky, A. A., N. M. Myasoedova, B. P. Baskunov, C. S. Evans, and L. A. Golovleva. 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. Biodegradation **11**:331-340.

Leontievsky, A. A., N. M. Myasoedova, L. A. Golovleva, M. Sedarati, and C. S. Evans. 2002. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentrations of chlorophenols. Applied Microbiology and Biotechnology **59**:599-604.

Lestan, D., and R. T. Lamar. 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology **62**:2045-2052.

Levin, L., L. Papinutti, and F. Forchiassin. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. Bioresource Technology **94**:169-176.

Li, D., M. Alic, J. A. Brown, and M. H. Gold. 1995. Regulation of Manganese Peroxidase Gene-Transcription by Hydrogen-Peroxide, Chemical Stress, and Molecular-Oxygen. Applied and Environmental Microbiology **61**:341-345.

Lopez, C., I. Mielgo, M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema. 2002. Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. Journal of Biotechnology **99**:249-257.

Lu-Chau, T. A., F. J. Ruiz-Duenas, S. Camarero, G. Feijoo, M. J. Martinez, J. M. Lema, and A. T. Martinez. 2004. Effect of pH on the stability of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase during heterologous production in *Emericella nidulans*. Bioprocess and Biosystems Engineering **26**:287-293.

Ma, Y., J. Y. Zhang, and M. H. Wong. 2003. Microbial activity during composting of anthracene-contaminated soil. Chemosphere **52**:1505-1513.

Maloney, S. 2001. Pesticide degradation. In Gadd G. (Ed.) Fungi in bioremediation. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

Manimekalai, R., and T. Swaminathan. 2000. Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Bioprocess Engineering **22**:29-33.

Martinez, A. T. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin- degrading heme peroxidases. Enzyme and Microbial Technology **30**:425-444.

Martinez, M. J., F. J. RuizDuenas, F. Guillen, and A. T. Martinez. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. European Journal of Biochemistry **237**:424-432.

Matsuzaki, F., and H. Wariishi. 2004. Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. Biochemical and Biophysical Research Communications **324**:387-393.

McAllister, K. A., H. Lee, and J. T. Trevors. 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation **7**:1-40.

McGrath, R., and I. Singleton. 2000. Pentachlorophenol transformation in soil: a toxicological assessment. Soil Biology & Biochemistry **32**:1311-1314.

Meysami, P., and H. Baheri. 2003. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. Advances in Environmental Research **7**:881-887.

Mileski, G. J., J. A. Bumpus, M. A. Jurek, and S. D. Aust. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **54**:2885-2889.

Mohan, S. V., S. Shailaja, M. R. Krishna, K. B. Reddy, and P. N. Sarma. 2006. Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. Process Biochemistry **41**:644-652.

Montiel, A. M., F. J. Fernandez, J. Marcial, J. Soriano, J. Barrios-Gonzalez, and A. Tomasini. 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. Biotechnology Letters **26**:1353-1357.

Moredo, N., M. Lorenzo, A. Dominguez, D. Moldes, C. Cameselle, and A. Sanroman. 2003. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. World Journal of Microbiology & Biotechnology **19**:665-669.

Moreira, M. T., I. Mielgo, G. Feijoo, and J. M. Lema. 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. Biotechnology Letters **22**:1499-1503.

Murphy, R. S., F. W. Kutz, and S. C. Strassman. 1983. Selected pesticide residues or metabolites in blood and urine specimens from a general population survey. Environ Health Perspect **48**:81-86.

Navia, R., L. Levet, M. L. Mora, G. Vidal, and M. C. Diez. 2003. Allophanic soil adsorption system as a bleached kraft mill aerobic effluent post-treatment. Water Air and Soil Pollution **148**:323-333.

Neilson, A. H., A. S. Allard, P. A. Hynning, M. Remberger, and T. Viktor. 1990. The environmental fate of chlorophenolic constituents of bleachery effluents. Tappi Journal **73**:239-247.

Nerud, F., J. Baldrian, J. Gabriel, and D. Ogbeifun. 2003. Nonenzymic degradation and decolorization of recalcitrant compounds. In Sasek V. et al. (Eds.) The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: Problems and solutions, pp. 29-48. Kluwer Academis Publishers.

Novotny, C., P. Erbanova, T. Cajthaml, N. Rothschild, C. Dosoretz, and V. Sasek. 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology **54**:850-853.

Novotny, C., K. Svobodova, A. Kasinath, and P. Erbanova. 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. International Biodeterioration & Biodegradation **54**:215-223.

Okeke, B. C., A. Paterson, J. E. Smith, and I. A. WatsonCraik. 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. Applied Microbiology and Biotechnology **48**:563-569.

Okeke, B. C., J. E. Smith, A. Paterson, and I. A. WatsonCraik. 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology **45**:263-266.

Oviedo, C., D. Contreras, J. Freer, and J. Rodriguez. 2003. A screening method for detecting iron reducing wood-rot fungi. Biotechnology Letters **25**:891-893.

Papinutti, V. L., L. A. Diorio, and F. Forchiassin. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **30**:157-160.

Park, C. W., T. H. Kim, S. Y. Kim, J. W. Lee, and S. W. Kim. 2003. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil in slurry and column reactors. Journal of Bioscience and Bioengineering **96**:429-433.

Paszczynski, A., M. B. Pastigrigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, and D. L. Crawford. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Applied and Environmental Microbiology **58**:3598-3604.

Podgornik, H., and A. Podgornik. 2004. Separation of manganese peroxidase isoenzymes on strong anion-exchange monolithic column using pH-salt gradient. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **799**:343-347.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology **57**:20-33.

Quintero, J. C., M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema. 2005. Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. Chemosphere **61**:528-536.

Quintero, J. C., M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Feijoo. 2006. An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. Chemosphere **63**:1005-1013.

Rabinovich, M. L., A. V. Bolobova, and L. G. Vasil'chenko. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. Applied Biochemistry and Microbiology **40**:1-17.

Radtke, C., W. S. Cook, and A. Anderson. 1994. Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. Applied Microbiology and Biotechnology **41**:274-280.

Rappe, C., H. Buser, and H. Bosshardt. 1979. Dioxins, dibenzofurans and other polyhalogenated aromatics: production, use, formation, and destruction. Annals of the New York Academy of Sciences **320**:1-18.

Reddy, C., and Z. Mathew. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. In. Gadd G. (Eds.) Fungi in bioremediation. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

Reddy, G. V. B., M. D. S. Gelpke, and M. H. Gold. 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by Phanerochaete chrysosporium: Involvement of reductive dechlorination. Journal of Bacteriology **180**:5159-5164.

Reddy, G. V. B., and M. H. Gold. 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. Microbiology-Sgm **146**:405-413.

Rodakiewicz-Nowak, J. 2000. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. Topics in Catalysis **11**:419-434.

Rodriguez, S., M. A. Longo, C. Cameselle, and A. Sanroman. 1999. Production of manganese peroxidase and laccase in laboratory-scale bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioprocess Engineering **20**:531-535.

Rodriguez-Vazquez, R., T. Cruz-Cordova, J. M. Fernandez-Sanchez, T. Roldan-Carrillo, A. Mendoza-Cantu, G. Saucedo-Castana, and A. Tomasini-Campocosio. 1999. Use of sugarcane bagasse pith as solid substrate for *P. chrysosporium* growth. Folia Microbiologica **44**:213-218.

Rothschild, N., A. Levkowitz, Y. Hadar, and C. G. Dosoretz. 1999. Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **65**:483-488.

Rowley, B. I., and A. T. Bull. 1977. Isolation of a yeast lyzing *Arthrobacter* species and production of lytic enzyme complex in batch and continuous flow fermentors. Biotechnology and Bioengineering **19**:879-899.

Ruiz-Duenas, F. J., M. Morales, M. Perez-Boada, T. Choinowski, M. J. Martinez, K. Piontek, and A. T. Martinez. 2007. Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: A site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study. Biochemistry **46**:66-77.

RuttimannJohnson, C., and R. T. Lamar. 1997. Binding of pentachlorophenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. Soil Biology & Biochemistry **29**:1143-1148.

Sahm, H., M. Brunner, and S. M. Schoberth. 1986. Anaerobic degradation of halogenated aromatic compounds. Microbial Ecology **12**:147–153.

Sato, A., T. Watanabe, Y. Watanabe, K. Harazono, and T. Fukatsu. 2002. Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. Fems Microbiology Letters **213**:213-217.

Schonborn, W., and K. Dumpert. 1990. Effects of pentachlorophenol and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on the microflora of the soil in a beech wood. Biology and Fertility of Soils **9**:292-300.

Sedarati, M. R., T. Keshavarz, A. A. Leontievsky, and C. S. Evans. 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. Electronic Journal of Biotechnology **6**:104-114.

Seech, A. G., J. T. Trevors, and T. L. Bulman. 1991. Biodegradation of pentachlorophenol in soil - the response to physical, chemical, and biological treatments. Canadian Journal of Microbiology **37**:440-444.

Seiglemurandi, F., R. Steiman, J. L. Benoitguyod, and P. Guiraud. 1992. Biodegradation of pentachlorophenol by micromycetes .1. Zygomycetes. Environmental Toxicology and Water Quality **7**:125-139.

Shin, K. S., Y. H. Kim, and J. S. Lim. 2005. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. Journal of Microbiology **43**:503-509.

Shiu, W. Y., K. C. Ma, D. Varhanickova, and D. Mackay. 1994. Chlorophenols and alkylphenols - a Review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment. Chemosphere **29**:1155-1224.

Shrivastava, R., V. Christian, and B. R. M. Vyas. 2005. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. Enzyme and Microbial Technology **36**:333-337.

Soto-Cordoba, S. M., J. Baeza, and J. Freer. 2001. Soxhlet extraction of pentachlorophenol from soil with in situ derivatization. Boletin De La Sociedad Chilena De Quimica **46**:179-185.

Srinivasan, C., T. M. Dsouza, K. Boominathan, and C. A. Reddy. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Bkm-F1767. Applied and Environmental Microbiology **61**:4274-4277.

Straube, W. L., C. C. Nestler, L. D. Hansen, D. Ringleberg, P. H. Pritchard, and J. Jones-Meehan. 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. Acta Biotechnologica **23**:179-196.

Sui, H., X. G. Li, G. Q. Huang, and B. Jiang. 2006. A study on cometabolic bioventing for the in situ remediation of trichloroethylene. Environmental Geochemistry and Health **28**:147-152.

Tam, S. C., S. A. Johnson, and A. Graham. 1999. The effect of organic structures on pentachlorophenol adsorption on soil. Water Air and Soil Pollution **115**:337-346.

Tien, M., and T. K. Kirk. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology **161**:238-249.

Tortella, G. R., M. C. Diez, and N. Duran. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. Critical Reviews in Microbiology **31**:197-212.

Tuomela, M., M. Lyytikainen, P. Oivanen, and A. Hatakka. 1999. Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Soil Biology & Biochemistry **31**:65-74.

Tuor, U., H. Wariishi, H. E. Schoemaker, and M. H. Gold. 1992. Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model-compound. Biochemistry **31**:4986-4995.

USEPA. 1979. Environmental Protection Agency. Suspended, cancelled, and restricted pesticides. Washington,D.C. Office of Pesticides and Toxic Substances.

USEPA. 1988. Health Advisory Office. Pentachlorophenol. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology **104**.

Valentin, L., G. Feijoo, M. T. Moreira, and J. M. Lema. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation **58**:15-21.

Valentin, L., T. A. Lu-Chau, C. Lopez, G. Feijoo, M. T. Moreira, and J. M. Lema. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. Process Biochemistry:In Press, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.1011.1011.

Valli, K., and M. H. Gold. 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology **173**:345-352.

Valo, R., and M. Salkinoja-Salonen. 1986. Microbial transformation of polychlorinated phenoxyphenols. Journal General Microbiology **32**:505-517.

Venkatadri, R., and R. L. Irvine. 1990. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **56**:2684-2691.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry **73**:1163-1172.

Walter, M., L. Boul, R. Chong, and C. Ford. 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. Journal of Environmental Management **71**:361-369.

Wang, Y. X., R. Vazquez-Duhalt, and M. A. Pickard. 2003. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. Canadian Journal of Microbiology **49**:675-682.

Wardle, D. A. 1992. A comparative assesment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. Biology Review **67**:321-358.

Wariishi, H., K. Valli, and M. H. Gold. 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* kinetic mechanism and role of chelators. Journal of Biological Chemistry **267**:23688-23695.

Wiesche, C., R. Martens, and F. Zadrazil. 1996. Two-step degradation of pyrene by white-rot fungi and soil microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology **46**:653-659.

Woo, S. H., M. W. Lee, and J. A. Park. 2004. Biodegradation of phenanthrene in soil-slurry systems with different mass transfer regimes and soil contents. Journal of Biotechnology **110**:235-250.

Wu, J., Y. Z. Xiao, and H. Q. Yu. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. Bioresource Technology **96**:1357-1363.

Xu, F. J., H. Z. Chen, and Z. H. Li. 2001. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. Bioresource Technology **80**:149-151.

Yu, G. C., X. H. Wen, R. Li, and Y. Qian. 2006. In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry **41**:1987-1993.

Zhang, J. L., and C. L. Qiao. 2002. Novel approaches for remediation of pesticide pollutants. International Journal of Environment and Pollution **18**:423-433.

Zhang, X. M., and J. Wiegel. 1990. Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in fresh-water sediments. Applied and Environmental Microbiology **56**:1119-1127.

Zouari, H., M. Labat, and S. Sayadi. 2002. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chryosporium* in free and immobilized cultures. Bioresource Technology **84**:145-150.

ANEXOS

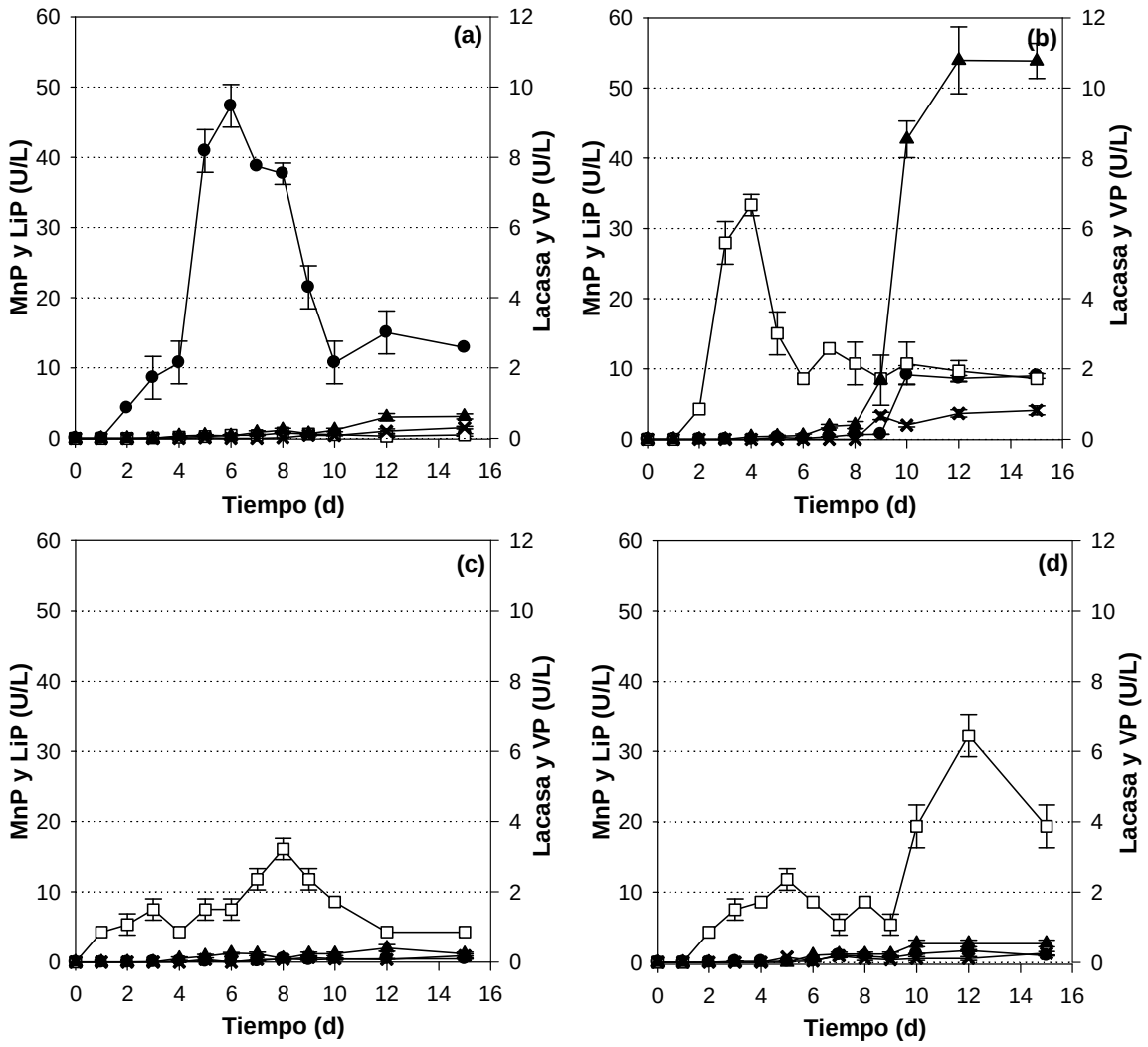

Figura A.1. Cinética enzimática de *Stereum hirsutum* en cultivo con glucosa con bajo (a) y alto contenido de nitrógeno (b) y celulosa con bajo (c) y alto contenido de nitrógeno (d). Simbología: ● MnP, □ LiP, ▲ Lacasa y × VP

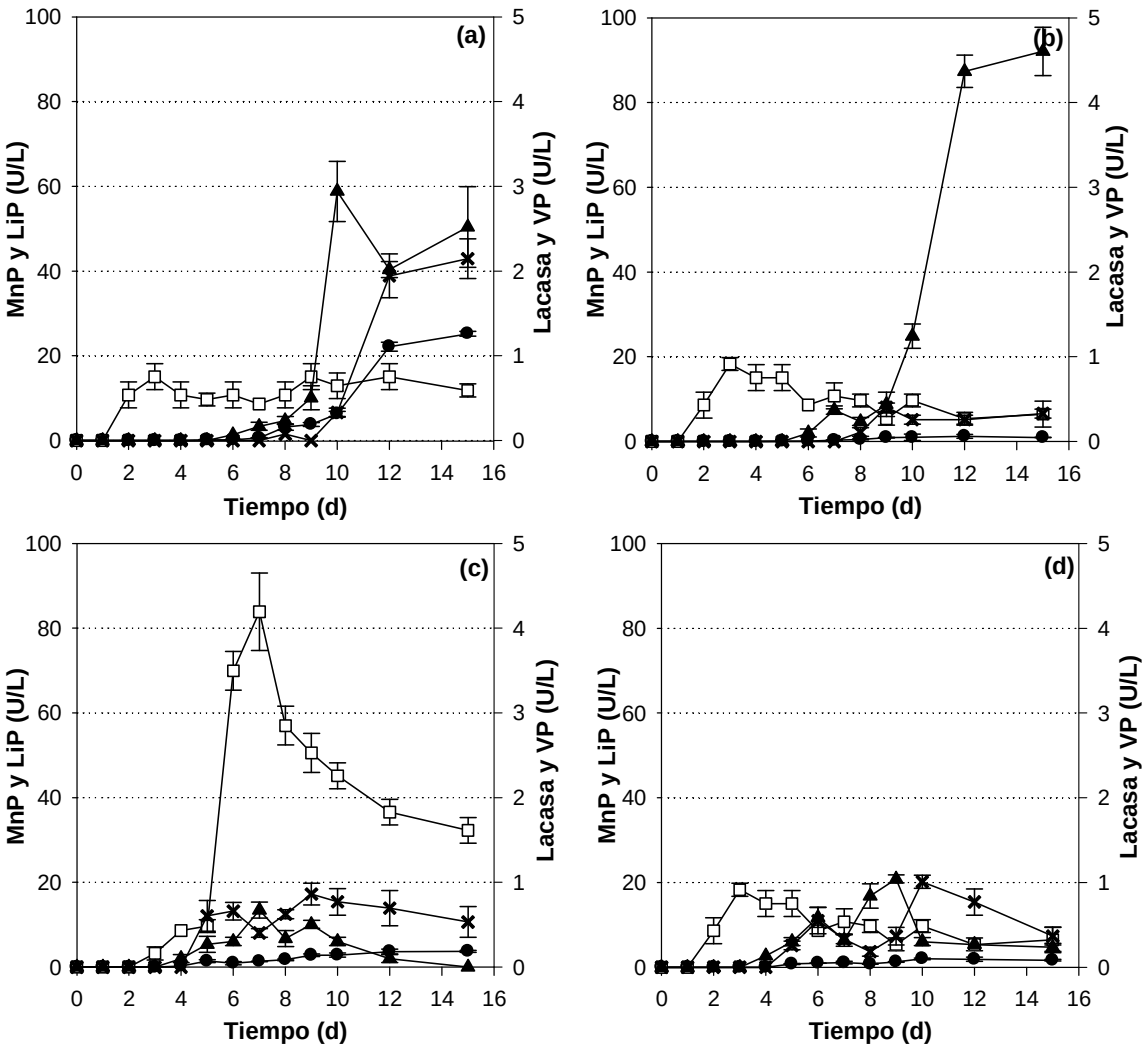

Figura A.2. Cinética enzimática de *Inonotus* sp. en cultivo con glucosa con bajo (a) y alto contenido de nitrógeno (b) y celulosa con bajo (c) y alto contenido de nitrógeno (d). Simbología: ● MnP, □ LiP, ▲ Lacasa y × VP

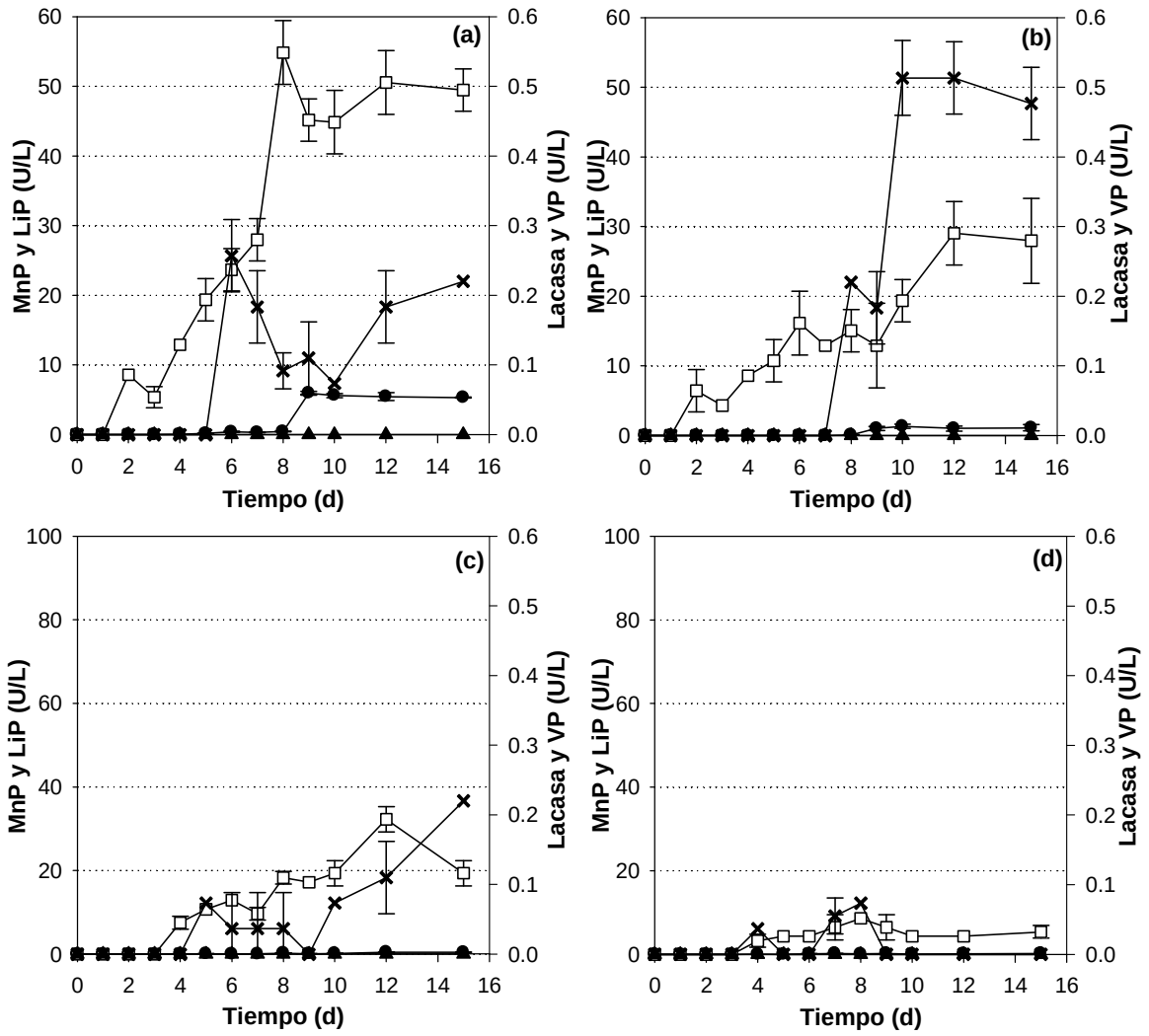

Figura A.3. Cinética enzimática de *P. chrysosporium* en cultivo con glucosa con bajo (a) y alto contenido de nitrógeno (b) y celulosa con bajo (c) y alto contenido de nitrógeno (d). Simbología: ● MnP, □ LiP, ▲ Lacasa y × VP