

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**



**ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN DE BISFENOL-A
POR *Trichoderma harzianum* CRECIDO EN
FERMENTACIÓN SUMERGIDA Y EVALUACIÓN DE LOS
INTERMEDIARIOS DE LA DEGRADACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**

PRESENTA:

BIÓL. BINICIO RAMÍREZ MENDOZA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. MIRIAM AHUACTZIN PÉREZ
DRA. LIBERTAD JUÁREZ SANTACRUZ

TUTORAS:

M. en C.A. GEORGINA PÉREZ MONTIEL
M en C. MADAÍ ROMERO MUÑOZ

Ixtacuixtla, Tlaxcala. Enero de 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**



**ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN DE BISFENOL-A
POR *Trichoderma harzianum* CRECIDO EN
FERMENTACIÓN SUMERGIDA Y EVALUACIÓN DE LOS
INTERMEDIARIOS DE LA DEGRADACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**

PRESENTA:

BIÓL. BINICIO RAMÍREZ MENDOZA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. MIRIAM AHUACTZIN PÉREZ
DRA. LIBERTAD JUÁREZ SANTACRUZ

TUTORAS:

M. en C.A. GEORGINA PÉREZ MONTIEL
M en C. MADAÍ ROMERO MUÑOZ

Ixtacuixtla, Tlaxcala. Enero de 2020





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04

Publicación: Febrero 2019

Revisión: 9001:2015 03

BIOL. BINICIO RAMÍREZ MENDOZA

CANDIDATO A MCSA

PRESENTE

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de titulación ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Estudio de la biodegradación de Bisfenol-A por Trichoderma harzianum crecido en fermentación sumergida y la evaluación de los intermediarios de la degradación", realizado bajo la dirección de la Dra. Libertad Juárez Santacruz y la Dra. Miriam Ahuactzin Pérez. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

M en C. A. Georgina Pérez Montiel

Dr. César Augusto Barrales Cortés

Dra. Miriam Ahuactzin Pérez

Dra. Libertad Juárez Santacruz

Handwritten signatures on lines, including 'Georgina Pérez Montiel' and 'Miriam Ahuactzin Pérez'.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
Ixtacuixtla, Tlax., 13 de enero de 2020.



DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO
COORDINADORA GENERAL DEL CIGyA Y DEL POSGRADO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE

c.c.p. Expediente



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala, al personal de Científico, Académico y Técnico del Centro de investigación en Genética y Ambiente, por haber contribuido a mi formación académica, profesional y personal, gracias por todo el apoyo y respaldo.

Al CONACyT por la beca número 631497.

Al **Laboratorio de Biología Experimental, UATx.** Por proporcionarme las facilidades, reactivos, equipos e instalaciones para la realización de todos experimentos de índole Biotecnológico en este proyecto.

A la **Dra. Miriam Ahuactzin Pérez y Dra. Libertad Juárez Santacruz,** por dirigirme en este trabajo de tesis, así como la confianza, oportunidad y responsabilidad brindada en la realización este proyecto, agradezco mucho que me permitieran ser parte de sus respectivos equipos de trabajo, así como de consejos y llamados de atención. Estoy sumamente feliz de haberlas conocido y en verdad fue un verdadero placer trabajar hombro a hombro.

A las **M. en C. A. Georgina Pérez Montiel y C. Dra. Madaí Romero Muñoz,** por su importante asesoramiento y constantes observaciones respecto a redacción y estructura del escrito, así como de las sugerencias de modificaciones del proyecto. Gracias por tanta

paciencia, respeto y profesionalismo. He entendido que para todas las cosas y actividades hay tiempos y formas, ¡MUCHAS GRACIAS!

Al **Dr. César Augusto Barrales Cortez** de la Universidad IBEROAMERICANA Puebla, por el asesoramiento respecto a la metodología empleada durante el análisis de muestras por GC-MS.

Al **Lic. Alberto Ortiz Pérez** por el asesoramiento, revisión, corrección de abstracts y así como su contribución en la revisión y traducción del artículo de maestría.

DEDICATORIA y AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi madre hermosa, la **Sra. Alicia Araceli Mendoza Bengochea**, con todo respeto, amor y esfuerzo te dedico este proyecto que me ha llevado a la obtención del grado académico, muchas muchas gracias por creer tanto en mí (tú Xhunco), por apoyarme en cada una de las etapas académicas, profesionales y sobre todo personales. Gracias por enseñarme a siempre ser agradecido con las personas que creen y confían en mí. *¡Eres la mejor, Tía Mari!* (Y que bueno que me dejaste venir a Tlaxcala).

A mi padre, el **Sr. Ángel Ramírez Zabaleta** y mis hermanos, **Roberto Campos Mendoza** y **Ángel Ramírez Mendoza** (Angelito de mi corazón) ustedes también forman parte de este equipo, se pasan de buenos, amables y respetuosos conmigo. ¡GRACIAS POR TANTO AMOR Y APOYO CONSTANTE!

A mis padrinos de mi corazón, el **Q.I. Alberto de Jesús Ortiz Zamora** y la **Mtra. Georgina Pérez Montiel**, no tengo palabras para describir todo lo feliz que soy y estoy por tenerlos en mi vida, gracias por tanto, hemos compartido momentos muy gratos y otros que no lo han sido tanto, pero siempre hemos estado los tres apoyándonos, padrino Alberto, gracias por ser un maravilloso amigo y abrirme las puertas de su casa, familia y corazón. Madrina Geo usted ha sido y será siempre la mejor consejera, gracias por tener en cada situación las palabras adecuadas en el momento preciso, usted es una amiga

increíble y todo el tiempo me dio tanta paz, seguridad y sobre todo amor. Por esto y muchas otras cosas, con toda humildad y cariño también les dedico este trabajo. Y aquí estamos “*Muy a la orden*”.

A esos seres que comenzaron con mi esclavitud (no es cierto jaja), a mis primeros mentores, **MIRIAM Y JOSÉ LUIS (el famosísimo wichin Torres García alias** “oh shit, give me a break”), los quiero mucho, son la mejor dupla en la investigación y he aprendido tanto de ustedes y aprovecho para disculparme por ser ese alumno molesto y gritón que tuvieron que soportar jajajaja. ¡Los quiero!

A mis hermanos espirituales:

Beto, gracias por todo el apoyo, tú has contribuido también en este proyecto, gracias por todo el cariño, confianza y respeto que me has brindado.

Itzel, compartí tanto contigo, y el estar contigo es sinónimo de siempre es estar en movimiento y “a las vivas”, gracias por dejarme entrar en tu mente y corazón, por compartirme tu maravilloso grupo de amigos, por quererme tanto y a pesar de haber vivido momentos difíciles no hemos dejado de apoyarnos, eres un ser maravilloso, un poco tóxica, pero maravillosa al fin! Te quiero tanto Carabias.

ROBERTO, DARA, MARTÍN y GABI, ocupan un lugar muy bonito en mi corazón, ¡Los amo!

A mi amigo y entrenador de voleibol **Lic. Luis Carlos Rosete**, eres un amigo extraordinario, gracias por tanta confianza y cariño.

A mis amigos Josafath y Antonio, por tanto cariño. Josa, gracias amigo por siempre motivarme a ser mejor y a creer en mí. Toñito de mi corazón gracias por siempre apoyarme y protegerme tanto, he aprendido tanto de ti, mi estimado Biólogo de clóset, los amo.

A mis compañeras de la maestría: Consuelo (comadrita de mi corazón), Virita, Mari (vámonos a los cocos), Ari, Bel, Bere y Magda.

Voy a extrañar tanto la hora del cafecito: **Dra. Edelmira, Dr. Héctor, Dra. Areli, Conta. Arsi y mi Dra. Corazón: Libertad**, fue una gozadera compartir cada conversación con ustedes. En verdad son un maravilloso grupo de trabajo y gracias por amar tanto lo que hacen y mejor aún, por hacerlo muy bien, Gracias.

A mis amigos y colegas: **Roberto C., Karlita y Omar**, los quiero mucho.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Experimental, muchas gracias por todo el apoyo y tanta paciencia.

Gabita, Isa, Geo, Marcia y Brix, son increíbles, los quiero y admiro muchísimo.

A **Ma. Del Pilar Carro Abdala**, gracias por todo el tiempo y cariño que me has dando, te quiero mucho mi Pili hermosa.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS	1
II. ÍNDICE DE TABLAS	3
III. RESUMEN	5
IV. ABSTRAC	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Contaminantes emergentes	10
1.1.1 Bisfenol-A	11
1.1.2 Efectos tóxicos del Bisfenol A	12
1.2 Fermentación	13
1.2.1 Fermentación sumergida (FS)	14
1.2.2 Diferencias entre fermentación sumergida (FS) y en estado sólido (FES)	14
1.3 Hongos filamentosos	15
1.3.1 Género <i>Trichoderma</i>	16
1.3.2 Ciclo de vida de <i>Trichoderma harzianum</i> (Rifai)	18
1.3.3 Sistema enzimático de hongos	19
1.4. Enzimas	20
1.4.1 Enzimas lacasas	20
1.4.2 Propiedades bioquímicas de las lacasas	24
1.4.3 Mecanismo catalítico de las lacasas	25
2. ANTECEDENTES	27
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVOS	33
4.1 General	34
4.2 Específicos	34
5. HIPÓTESIS	35
6. METODOLOGÍA	37
6.1 Microorganismo de estudio	38
6.2 Desarrollo de la fermentación	38
6.2.1 Medio de cultivo líquido para los diferentes tratamientos	38
6.2.2 Esterilización e inocuidad de medio de cultivo empleado en la fermentación sumergida	38
6.2.3 Siembra de inóculos de <i>T. harzianum</i> y desarrollo de la fermentación sumergida	39

6.4. Evaluación de la velocidad específica de crecimiento	40
6.5. Perfiles de pH.....	41
6.6 Determinación del consumo glucosa como fuente de carbono asimilable	41
6.7 Cuantificación de la actividad enzimática extracelular	41
6.7.1 Actividad enzimática de lacasas.....	41
6.7.2 Parámetros cinéticos enzimáticos.....	42
6.8. Análisis de los subproductos de degradación de BFA en el ECE por Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS)	42
6.8.1 Preparación de las muestras	42
6.8.2 Análisis de los sobrenadantes en GC-MS.....	43
6.9 Análisis estadístico	43
7. RESULTADOS.....	44
7.1. Parámetros cinéticos evaluados durante el crecimiento de <i>T. harzianum</i> en FS	45
7.2 Consumo de glucosa por <i>T. harzianum</i> en FS	47
7.3 Análisis de los cambios de pH durante la fermentación de cada tratamiento	49
7.4 Actividad extracelular de lacasas producidas por <i>T. harzianum</i> con diferentes tratamientos de BFA en fermentación sumergida	49
7.5. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>T. harzianum</i> en los diferentes tratamientos en fermentación sumergida	52
7.6. Identificación por GC-MS de intermediarios de la degradación de BFA por <i>T. harzianum</i> en fermentación sumergida	53
8. DISCUSIÓN	57
8.1 Efecto del BFA en el crecimiento de <i>T. harzianum</i>	58
8.2 Efecto del BFA en la producción y actividad enzimática de lacasas.....	59
8.3 Efecto del pH en la producción y actividad enzimática.....	60
8.4 Degradación de BFA.....	61
9. CONCLUSIÓN	63
10. REFERENCIAS.....	65

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Bisfenol A.....	11
Figura 2. Clasificación taxonómica del género <i>Trichoderma</i>	17
Figura 3. <i>Trichoderma harzianum</i> crecido sobre agar de papa y dextrosa (PDA).	19
Figura 4. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas (modificada de Mate y Alcalde, 2016).....	23
Figura 5. Matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio GYE para fermentación sumergida.....	39
Figura 6. Producción de biomasa de <i>T. harzianum</i> en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS.	46
Figura 7. Consumo de glucosa por <i>T. harzianum</i> crecido en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA	48
Figura 8. . Perfiles de pH de los cultivos de <i>T. harzianum</i> crecido en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS.	50
Figura 9. Actividad de enzimas lacasas producidas por <i>T. harzianum</i> crecido en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS.	51

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo de glucosa y extracto de levadura (GYE)*	38
Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>T. harzianum</i> crecido sobre BFA en FS	47
Tabla 3. Parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas de <i>T. harzianum</i> crecido en diferentes tratamientos de BFA en fermentación sumergida.	52
Tabla 4. Listado de los subproductos de la degradación de BFA por <i>T. harzianum</i> en fermentación sumergida analizados en GC-MS. ¡Error! Marcador no definido.	

III. RESUMEN

El Bisfenol A (BFA) o 2,2-bis (4 -hidroxifenil) propano, es un monómero constituido químicamente de dos anillos fenólicos unidos a través de un puente de carbono, es utilizado en la industria plástica como elemento y/o componente destinado a la fabricación de productos de policarbonato y resinas epoxicas (envases para alimentos y bebidas, vajillas, papel térmico y alimentos enlatados). El BFA ha sido identificado como un producto químico altamente tóxico y es declarado un problema social, ambiental y global. El objetivo de este estudio fue evaluar la degradación de diferentes concentraciones de BFA por *T. harzianum* crecido en un sistema de fermentación sumergida para ser empleado como estrategia de biorremediación de matrices ambientales. Asimismo, se estimó la velocidad específica de crecimiento (μ), biomasa máxima ($X_{m\acute{a}x}$), pH, consumo de glucosa y productividad y actividad de enzimas lacasas de *T. harzianum* en concentraciones de 50 y 100 mg/L de BFA. En ambos tratamientos, *T. harzianum* presentó una velocidad específica de crecimiento similar (0.05 y 0.06 h⁻¹ respectivamente). En el medio con 100 mg/L de BFA se cuantificó la mayor producción de biomasa. Con respecto a la actividad enzimática, la mayor productividad y actividad de las lacasas se presentó en el tratamiento con 50 mg/L. En el tratamiento con 50 mg/L de BFA se identificaron 34 diferentes compuestos productos del desarrollo de *T. harzianum*, además con base en los datos del tiempo de consumo de la fuente inicial de carbono, se sugiere que este hongo utiliza al BFA como una fuente secundaria de carbono y energía, degradándolo a compuestos menos tóxicos.

IV. ABSTRAC

Bisphenol A (BPA) or 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane, is a chemically constituted monomer of two phenolic rings joined through a carbon bridge, is used in the plastics industry as an element and / or component intended to the manufacture of polycarbonate products and epoxy resins (food and beverage containers, dishes, thermal paper and canned food). The BPA has been identified as a highly toxic chemical and is declared a social, environmental and global problem. The objective of this study was to evaluate the degradation of different concentrations of BPA by *T. harzianum* grown in a submerged fermentation system to be used as a bioremediation strategy for environmental matrices. Likewise, the specific growth rate (μ), maximum biomass (X_{max}), pH, glucose consumption and productivity and activity of laccases enzymes of *T. harzianum* in concentrations of 50 and 100 mg/L of BPA were estimated. In both treatments with BPA, *T. harzianum* showed a similar specific growth rate (0.05 and 0.06 h⁻¹ respectively). In the medium with 100 mg/L of BPA the highest biomass production was quantified. With respect to the enzymatic activity, the higher productivity and activity of the laccases was presented in the treatment with 50 mg/L with respect to the treatment with 100 mg/L of BPA. In the treatment with 50 mg/L of BPA, 34 different compounds derived from the development of *T. harzianum* were registered, and also based on data on the consumption time of the initial carbon source, it is suggested that *T. harzianum* uses BPA as a secondary source of carbon and energy, degrading it to less toxic compounds.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes emergentes

El término de contaminantes emergentes (CE) generalmente se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, actualmente están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de generar un impacto ecológico, así como efectos adversos a la salud. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesariamente deben ser recalcitrantes en el medio para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación y/o remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Barceló et al., 2007; Stuart et al., 2012). Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de diferentes fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, residuos de plantas de tratamiento, de efluentes hospitalarios, de las actividades agrícolas, ganaderas y de los tanques sépticos, los cuales contienen una gran variedad de componentes orgánicos específicos y CE que se generan en diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han especificado (Eggen et al., 2010), asimismo, las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos; motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras. Los CE comprenden una amplia gama de compuestos químicos como los productos farmacéuticos, de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales, que no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento de aguas; también incluyen la síntesis de nuevos compuestos químicos o cambios en el uso y disposición de los productos químicos ya existentes, de los cuales hay una limitada información disponible sobre el efecto que pueden causar en la salud humana y en la ecología (Murray et al., 2010). Por estas razones, la mayoría de las nuevas investigaciones han centrado sus estudios en la aparición de estos contaminantes orgánicos en aguas superficiales, como las utilizadas en actividades domésticas, que luego reciben tratamiento químico; en aguas de arroyos; aguas residuales con tratamiento biológico, y en agua potable, entre otras, ya que estas son más

susceptibles de contener concentraciones mayores de CE que las aguas subterráneas (Stuart et al, 2012).

1.1.1 Bisfenol-A

El bisfenol-A (BFA) o 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano, es un compuesto orgánico formado por dos moléculas de fenol unidas por un puente metilo y 2 grupos metilo, fue descubierto en 1891 por el químico ruso Alexander Pavlovich Dianin, su uso comercial comenzó en 1957; sintetizado a partir de la condensación de 2 moléculas de fenol con 1 de acetona en presencia de un catalizador (una resina de intercambio iónico fuertemente ácida). La estructura molecular está formada por 1 átomo de carbono tetraédrico central con 2 grupos metilo y 2 grupos fenol (Figura 1), presenta una solubilidad en agua de 120-300 mg/L a temperatura ambiente (EPA, 2014), se disocia en matrices alcalinas (pK_a 10.29 + 0.69) y presenta un coeficiente de partición octanol/agua $Kow = 3.64 \pm 0.32$, (Corrales et al., 2015).

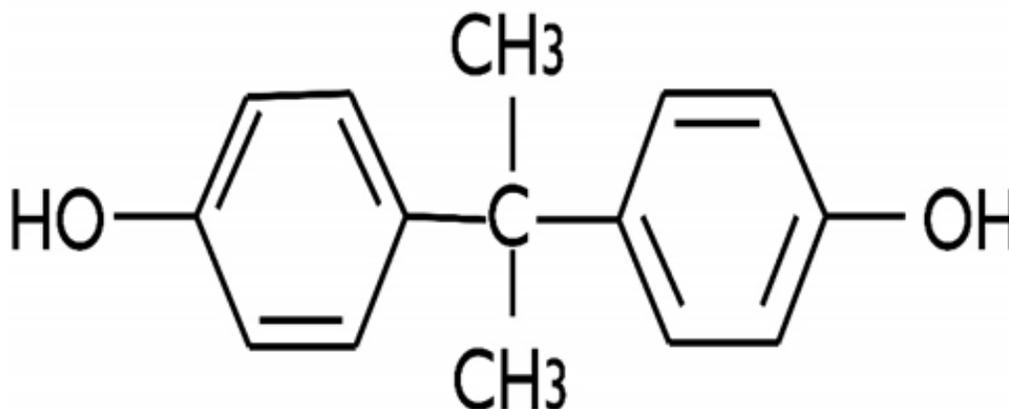


Figura 1. Estructura química del Bisfenol A

Este compuesto se utiliza como intermediario (aglutinante, plastificante y endurecedor) en plásticos, pinturas/lacas, materiales aglomerantes y materiales de relleno, así como aditivo para la eliminación del exceso de ácido clorhídrico durante

la fabricación del cloruro de polivinilo (PVC), en retardantes de llama, líquidos de frenos y papeles térmicos. Alrededor del 95% del BFA producido en la industria se emplea en la fabricación de resinas de policarbonato (71%) y resinas epoxi (29%) (Rikz, 2001; Huang et al., 2011).

Se estima que las matrices ambientales con mayor acumulación de BFA son principalmente aquellas asociadas con el agua y sólidos suspendidos (53%), el suelo (25%) o los sedimentos (23%) (Sangai et al, 2016). Es recurrente que el Bisfenol-A se lixivie durante la fabricación, transporte y procesamiento de productos químicos, además durante las emisiones posteriores al consumo a través de la descarga de las plantas municipales de tratamiento de aguas residuales a diferentes efluentes; la lixiviación de vertederos, la combustión de desechos domésticos y la descomposición natural de los plásticos en el ambiente (Sangai et al., 2016).

1.1.2 Efectos tóxicos del Bisfenol A

La exposición de los organismos al BFA se presenta a través de diferentes maneras, es decir, cuenta con diferentes vías de exposición: oral, inhalatoria y cutánea. Las fuentes más importantes de exposición al BFA son a través de: la dieta, agua, polvo, al contacto con papel térmico, materiales dentales y dispositivos o aparatos utilizados en medicina (Geens et al., 2012). Debido a la presencia en el ambiente del BFA, la población se encuentra expuesta a este de manera crónica y/o en las etapas más sensibles de la vida (Flint et al., 2012).

El BFA forma parte de un grupo de compuestos denominados disruptores endocrinos (DE) los cuales son consideradas sustancias exógenas al organismo que se encuentran en el ambiente, en los alimentos y productos destinados a los consumidores, que interfieren con la biosíntesis de hormonas, en el metabolismo y acciones resultantes de este, provocando una alteración en la homeostasia normal del individuo expuesto o en la de sus descendientes (Diamanti-Kandarakis et al.,

2009). Se ha demostrado que el BPA tiene afinidad por los receptores de los estrógenos y, por tanto, posee la capacidad de producir efectos estrogénicos. Es importante destacar que los efectos más graves de los DE, y por tanto del BFA, se han visto en hijos de madres expuestas durante el embarazo y lactancia, por ello muchos estudios se centran en la evaluación de la exposición prenatal y los efectos adversos en niños (Braun et al., 2011).

Los DE siguen un comportamiento particular en sus curvas dosis-efecto, es decir, el efecto máximo se produce a dosis bajas; por lo que es de interés, evaluar y analizarlos a concentraciones muy bajas (Vandenberg et al., 2012).

1.2 Fermentación

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se define como el proceso por el cual los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la descomposición de sustancias orgánicas, dicho proceso puede darse en ausencia o presencia de oxígeno (Hernández, 2003). Desde el enfoque bioquímico, la fermentación es definida como un conjunto de reacciones catabólicas que producen adenosín trifosfato (ATP), en las cuales los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones, produciendo el ATP por fosforilación a nivel sustrato (Madigan et al., 1998). Se trata de un proceso intracelular, catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico (Hesseltine, 1998). Desde el punto de vista microbiológico, la fermentación es un proceso que degrada moléculas complejas para transformarlas en otras más simples en el que los microorganismos producen metabolitos y/o biomasa, a partir de la utilización de sustancias orgánicas. En general la descomposición de los sustratos se lleva a cabo por enzimas producidas por los microorganismos implicados en los procesos fermentativos, los cuales pueden obtener su energía y su fuente de carbono por la degradación de los compuestos orgánicos (Suárez y Nieto, 2013).

Las fermentaciones pueden clasificarse como naturales o artificiales, según haya o no intervención del hombre, por el tipo de producto que se desea obtener, por la presencia o ausencia de oxígeno, además según el estado del sustrato. Se clasifican en fermentación sumergida (FS) y fermentaciones en estado sólido (FES) (Hernández, 2003; Suárez y Nieto, 2013).

1.2.1 Fermentación sumergida (FS)

Es aquel sistema de cultivo en el cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de nutrimentos implicados en el proceso, es decir, que hay una solución homogénea de estos, lo cual implica que el microorganismo de estudio crecerá en un medio completamente acuoso y en el caso de los hongos miceliales, estos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. Este es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la FES y el producto final es mucho más fácil de recuperar (Chen y Seviour, 2007). La FS a su vez puede dividirse en continua, por lote y alimentada, según la entrada y salida tanto del sustrato como del producto, respectivamente. El desarrollo de los microorganismos se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, otra de crecimiento (fase logarítmica), una estacionaria y, finalmente llegar a la de muerte. (Suárez y Nieto, 2013).

1.2.2 Diferencias entre fermentación sumergida (FS) y en estado sólido (FES)

La principal diferencia con la FES radica en que el crecimiento de los microorganismos se efectúa en un sustrato sólido con una limitada concentración de agua, pero con la suficiente para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Fazenda et al., 2008). Este tipo de fermentación presenta problemas como la baja transferencia de O₂ y CO₂, remoción de calor y la contaminación bacteriana o por hongos levaduriformes, además, es un proceso lento debido precisamente a su baja actividad de agua, convirtiéndose en un

proceso difícil de monitorizar, controlar y escalar, dificultando su implementación en la industria a pesar de que la mayoría de ella, en especial la farmacéutica, la utiliza. Ante esto la FS se ha convertido en el mejor método para aplicación industrial por el fácil control de la transferencia de O₂. Además, la homogeneidad del cultivo es muy superior, facilitando y optimizando la repetitividad y monitoreo del proceso dependiendo de la cepa y metabolitos de interés (Suárez y Nieto, 2013).

1.3 Hongos filamentosos

Los hongos tienen un gran impacto en la vida diaria, se utilizan en biotecnología para obtener diversos productos para la humanidad, desempeñan un papel importante en los ecosistemas, proporcionando un equilibrio saludable. Los hongos filamentosos son un grupo diverso que usualmente se conoce con el nombre de "mohos", es común observarlos en alimentos en descomposición y sobre detritos, forman una estructura en forma de agregado de hifas las cuales se organizan para dar soporte a los procesos de producción y diseminación de esporas (Kavanagh, 2005), juegan un papel importante en la biosfera como descomponedores de materia orgánica, lo que permite el reciclaje de carbono, nitrógeno y fósforo (Adrio y Demian, 2003). Las hifas, poseen forma de cilindro largo con un ápice ligeramente cónico, el término se acuñó inicialmente hace unos 2 siglos para describir un "tallo más o menos filamentosos, acuoso o fibroso, que se forma por ramificaciones repetidas". Los hongos filamentosos están constituidos por cadenas de hifas independientes que en conjunto forman una red denominada micelio, éste puede o no subdividirse en células individuales mediante paredes transversales o septos. Las hifas de los hongos sin septos son continuas y multinucleadas (Alexander, 1980). La mayoría de las especies de hongos se desarrollan en condiciones mesofílicas (10-30 °C); requieren de azúcares en el medio para su crecimiento, además de condiciones ácidas preferentemente a pH de 4 a 6, y atmósferas aeróbicas (Walker y White, 2017). Muchas especies de hongos filamentosos se utilizan en procesos industriales para la producción de ácidos orgánicos, antibióticos, vitaminas y enzimas, para la producción industrial de metabolitos, la

cual ha aumentado considerablemente en los últimos años (Papagianni et al., 2001), destacando el potencial de secreción de enzimas hidrolíticas, y su formación de hifas con capacidad en matrices sólidas y resistencia a condiciones de alta presión osmótica y pH (Lynd et al., 2002; Escudero et al., 2013).

Distintos tipos de hongos mesófilos o termófilos pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Dentro de los diferentes géneros y especies de hongos productores de celulasas se encuentran *Trichoderma*, *Phanerochaeta*, *Sporotrix*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, además de algunos hongos comestibles como *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* y *Pleurotus* sp. (Lynd et al., 2002). Estos organismos están ampliamente distribuidos y crecen típicamente sobre o dentro de materiales sólidos como plantas, granos y animales, son eficientes en la producción de enzimas utilizadas para la degradación de los sustratos, que les sirven como medio de soporte y fuente de alimento para la sobrevivencia (Kazunari et al, 2011).

Dentro de los hongos filamentosos, se incluyen organismos de importancia económica ya sea benéfica o no. Los hongos del género *Hypocrea* se caracteriza por ser un organismo empleado en el control biológico, actúa sobre hongos patógenos de plantas e insectos (Hidalgo, 1989), en el caso de algunas especies del género *Trichoderma*, son empleadas en el control de hongos fitopatógenos (Domsch et al.; 1993; Rossman, 1996).

1.3.1 Género *Trichoderma*

Este género fue descrito por Persoon en 1794, posteriormente Rifai en 1969 describió nueve especies considerando diferencias morfológicas y fisiológicas: *Trichoderma piluliferum* Webster & Rifai, *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *Trichoderma hamatum* (Bon) Bain, *Trichoderma koningii* Rifai, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai,

Trichoderma pseudokoningii Rifai y *Trichoderma viride* Pers ex S. F. Gray (Martínez-Infante y Peteira, 2015)

Las especies del género *Trichoderma* están representadas por un grupo de hongos filamentosos de acuerdo con Samuels (2005) y Jaklitsch et al. (2006), la clasificación taxonómica de las especies pertenecientes a este género es la siguiente:

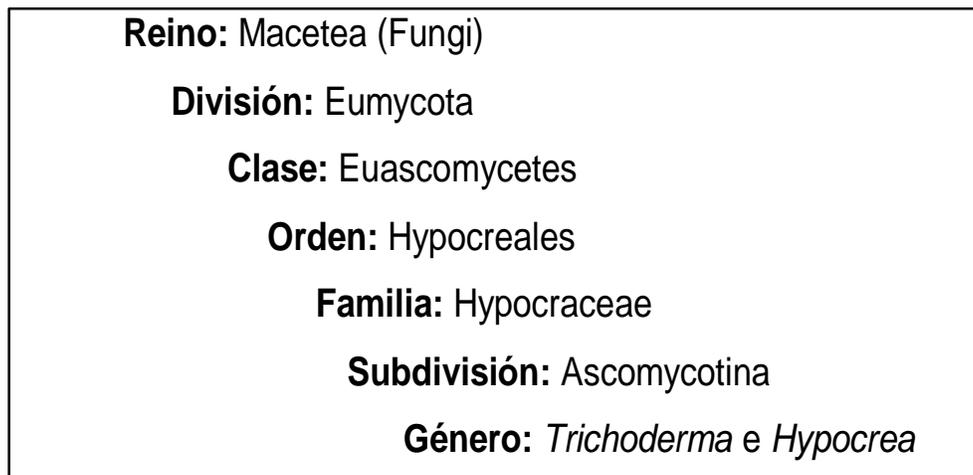


Figura 2. Clasificación taxonómica del género *Trichoderma* (Jaklitsch et al., 2006).

A la fecha se han descrito cerca de 40 taxones, sin embargo, basados en la morfología anamorfa del orden de los Hypocreales, el número real podría superar los 200 taxones. La mayoría de las especies de *Trichoderma*, se han descrito de Norteamérica y Europa (Samuels, 1996).

La temperatura óptima de crecimiento en agar y producción de micelio es de 20 a 28 °C, aunque puede crecer bajo condiciones extremas desde 6 hasta 32 °C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es del 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente a la azul y violeta, ya que promueve la formación de esporas, crecimiento micélico y la coloración (Hidalgo, 1989; Domsch et al., 1993). El micelio es escaso y velutinoso, la escasa formación de micelio aéreo hace que la superficie sea

levemente hirsuta, con el tiempo el centro de la colonia se torna algodonoso y se observa la esporulación en la zona periférica de la colonia en pústulas conidiógenas de color blanco, que luego se tornan verde grisáceo, el medio se torna a color vino tinto (Domsch et al., 1993).

1.3.2 Ciclo de vida de *Trichoderma harzianum* (Rifai)

T. harzianum (Rifai), puede ser encontrado en diferentes tipos de materia orgánica y suelos, está adaptado a diferentes condiciones ambientales, lo que facilita su amplia distribución, algunas especies se desarrollan en sitios secos y templados, y otras en templados y fríos. Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos. Se han identificado diferentes especies y cepas, en el cultivo de hongos comestibles, algunas son inofensivas y otras muy dañinas, por lo que su relación antagónica con los hongos cultivados todavía no está completamente conocida y varía entre especies y cepas (Seaby, 1996).

Las especies de este género normalmente se desarrollan bajo condiciones ácidas (pH 4.5 a 5) con alto contenido de humedad y contenido estable de bióxido de carbono en la atmósfera. Varios factores genéticos asexuales como la recombinación parasexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación entre los núcleos en un solo organismo (talo). Así, los hongos son altamente adaptables y evolucionan rápidamente (Rifai, 1969; Przybyłowicz y Donoghue, 1988; Stamets y Chilton, 1983; Vijay y Sohi, 1989; Pandey y Tewari, 1990).

Los hongos de este género tiene la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos haciéndolos un excelente agente de biocontrol (Michel-Aceves, 2001), lo cual radica en el hecho de que presenta un amplio espectro antagónico para muchos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Phytophthora* entre otros, que afectan a diversos cultivos de interés socioeconómico como maíz, cebolla, tomate, fríjol, trigo, etc. (Chet et al., 1998).



Figura 3. *Trichoderma harzianum* crecido sobre agar de papa y dextrosa (PDA).

El ciclo de vida de *T. harzianum* (Rifai), inicia cuando las hifas crecen y se ramifican alcanzado un diámetro de entre 5 a 10 μ . Presenta esporulación asexual ocurre al liberarse las esporas cuando alcanzan un diámetro de 3 a 5 μ de diámetro. En el estadio temprano de *T. harzianum* (Rifai), el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación (Figura 3). En condiciones *in vitro* las colonias de *T. harzianum* (Rifai), crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de dextrosa y papa (PDA) a 25°C.

1.3.3 Sistema enzimático de hongos

La ruptura del enlace carbono-carbono es una propiedad que poseen los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos, logrando la conversión de estos a CO₂ y H₂O, lo que ofrece un gran potencial para ser utilizados

en procesos de remoción de agentes contaminantes. La capacidad altamente oxidante de sus enzimas les otorga ser considerados como organismos potenciales para degradar diferentes compuestos orgánicos polinucleares, así como diversos compuestos xenobióticos. Entre estos contaminantes podemos encontrar pesticidas, hidrocarburos aromáticos (benzo-pireno, fenantreno y pireno), compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas y bifenilospoliclorados) y azocolorantes (Bezalel et al., 1996).

1.4. Enzimas

Son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico (Lehninger, 1995). Están diseñadas para catalizar reacciones químicas con alta selectividad y eficiencia en términos de ahorro de energía. A pesar del hecho de que las enzimas tienen una amplia diversidad de aplicación, su uso en procesos industriales a gran escala se ve obstaculizado en muchos casos por su poca o nula estabilidad operativa y baja resistencia a las condiciones del proceso. En numerosas ramas de la industria se utilizan procesos enzimáticos, entre otras cosas se debe a que son rápidos, realizan transformaciones químicas específicas, ahorran reactivos y energía (Wesenberg et al., 2003)

1.4.1 Enzimas lacasas

Las lacasas son proteínas N-glicosiladas con un contenido en carbohidratos que representa entre el 10 y el 45% del peso de la molécula, generalmente, aparecen en forma monomérica, con una masa molecular entre 36 y 80 kDa, aunque la mayoría se encuentra entre 50-70 kDa. Presentan un punto isoeléctrico (pI) entre 2.6 y 4.5, y su máxima actividad varía en un rango de pH, entre 2.0 y 8.5 (Thurston, 1994; Leonowicz et al., 2001; Saparrat et al., 2002; Wesenberg et al., 2003).

Las lacasas (p-difenol: oxígeno oxido reductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas de tipo fenoloxidasas ampliamente distribuidas en plantas, insectos, hongos y algunas bacterias, con funciones según el requerimiento de cada organismo (Ullrich y Hofrichter, 2007). En plantas, intervienen en la síntesis de lignina y en el proceso de respuesta primaria, en hongos producen pigmentación de conidios, síntesis de la pared celular y, además, son parte fundamental del proceso de ligninólisis llevado a cabo principalmente por Basidiomycetes de pudrición blanca (Thurston, 1994).

En general, las reacciones que producen las lacasas es la oxidación directa de las unidades de lignina fenólicas, compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos, con el oxígeno molecular como aceptor de electrones reduciéndose a agua. Además, estas participan en la producción de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 , OH^- y O_2^- (Guillén et al., 2000), así como en la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} . Tanto el Mn^{3+} como el radical hidroxilo intervienen en una fase inicial de la ligninólisis cuando las enzimas no pueden penetrar a través de las paredes celulares de las plantas (Evans et al., 1994; Joseleau et al., 1994). Además, estas enzimas puede producir demetoxilación de compuestos producidos en la oxidación directa de la lignina por las peroxidasas LiP y MnP (Thurston, 1994; Leonowicz et al., 1999).

Las lacasas se caracterizan por tener una baja especificidad de sustrato, actividad en función de factores como el pH, el grado de aireación, la agitación del medio de cultivo, la fuente de nitrógeno o la presencia de inductores de la actividad. Los inductores son compuestos que influyen de forma considerable en la actividad de la enzima e incluso en la expresión de los genes que la codifican. De hecho, se sabe que los hongos de la pudrición blanca producen diferentes isoenzimas de la lacasa de forma constitutiva o por inducción (Bollag et al., 1984; Muñoz et al., 1997a, De la Rubia et al., 2002).

Se han identificado varios compuestos inductores de diferente naturaleza, como la 2,5-xilidina (Quaratino et al., 2007; Minussi et al. 2007), compuestos fenólicos como

la vainillina y determinadas fuentes de carbono (Dekker et al., 2007). Además, se ha descrito que pueden inducir la actividad lacasa por el crecimiento conjunto del organismo de estudio productor de esta actividad con otro tipo de hongo (Zhang et al., 2006).

Uno de los inductores de la actividad lacasa más estudiado, es el Cu, microelemento presente en la estructura de la enzima, capaz de aumentar significativamente los niveles de la actividad de esta. A nivel genético se ha estudiado el papel del Cu en la regulación del gen de lacasa y la expresión de las diferentes isoenzimas (Palmieri et al., 2000; Quaratino et al., 2008). Hoshida et al. (2005) demostraron que son necesarios niveles elevados de Cu en el medio para la producción de lacasa activa por hospedadores heterólogos y que es un elemento esencial para el proceso transcripcional de esta proteína. Sin embargo, el Cu también puede inhibir la producción de lacasa por algunos hongos como *Panus tigrinus* (Quaratino et al., 2007).

Otro tipo de compuestos influyentes en la actividad catalítica de esta enzima son los mediadores, para las lacasas, son compuestos de bajo peso molecular que actúan permitiendo la formación de interacciones específicas entre lignina y enzimas ligninolíticas, que de otra manera están limitadas debido al gran volumen y complejidad del polímero. Además, estos actúan aumentando el bajo potencial Redox de estas enzimas, que sólo permite que la oxidación directa por las lacasas se realice sobre las unidades fenólicas de la lignina, que suponen menos del 10% del total del polímero (Martínez et al., 2005). Debido a estos mediadores la lacasa, aumenta de forma considerada su potencial Redox y es capaz de degradar compuestos no fenólicos e incluso xenobióticos. Estos mediadores pueden ser compuestos naturales, como ácidos orgánicos o fenoles procedentes de la propia ligninólisis (Camarero et al., 2005), o sintéticos, entre los que destacan los inductores con el grupo funcional N-OH, utilizados en la degradación de pulpa de la industria papelera (Wesenberg et al., 2003).

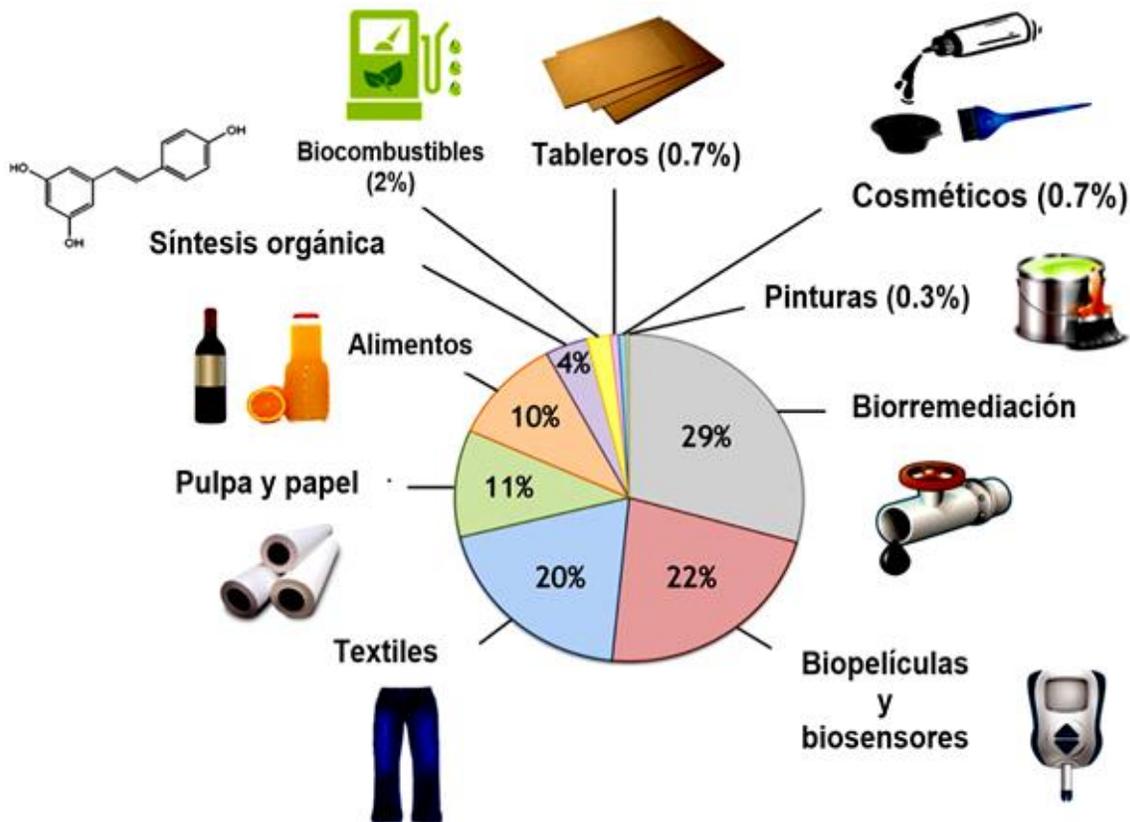


Figura 4. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas (modificada de Mate y Alcalde, 2016).

La enzima lacasa es la encargada de la catálisis en reacciones de oxidación en una variedad de organismos, pertenecen a un tipo de metaloproteínas denominadas oxidasas multicobre (Solomon y Lowery, 1993), entre las que se incluyen otras enzimas como la ascorbato oxidasa de plantas o la ceruloplasmina presente en el plasma sanguíneo de mamíferos (Gray et al., 2000). Las lacasas se encuentran distribuidas tanto en organismos eucariotas (Dittmer et al., 2004), como en eubacterias (Martins et al., 2002), actinomicetos e incluso arqueobacterias (Claus, 2003). Presentan diferentes funciones dependiendo del tipo de organismo, en plantas, por ejemplo, están implicadas con una respuesta primaria a heridas (Davies y Ducros, 2001), en los tejidos leñosos, forman parte del sistema de síntesis de lignina. Mientras que, en hongos presentan diversas funciones en el caso de *Aspergillus nidulans* pose al menos dos lacasas; una de ellas implicada en la

coloración verde de los conidios y otra expresada en los extremos de la hifa, con una posible función en la síntesis de la pared celular.

Se ha descrito además las lacasas en patogénesis, donde podrían estar relacionadas con el ataque inicial al hospedador por hongos fitopatógenos (Lewis y Yamamoto, 1990). Así, la inhibición de la actividad lacasa en el hongo *Botrytis cinerea* previene la infección en curcubitáceas (Viterbo et al., 1993). *Cryptococcus neoformans* es un hongo patógeno de humanos, causante de la criptocociosis, principal patógeno oportunista en enfermos inmunodeprimidos, la actividad lacasa aparece como uno de los principales factores de virulencia (Zhu y Williamson, 2004).

Uno de los campos que más se ha investigado acerca de la función de las lacasas es la degradación de lignina y otros compuestos recalcitrantes por basidiomicetos de pudrición blanca (Saparrat et al., 2002); además, éstos presentan mayores niveles de expresión de lacasas con potenciales de oxidorreducción más altos, características muy importantes en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Las lacasas tienen una implicación directa en el proceso de degradación de la lignina (Claus, 2004), sin embargo su función no está del todo clara, pudiendo participar a través de la activación de mediadores de bajo peso molecular (Srebotnik y Hammel, 2000) o bien, junto con oxidasas productoras de H₂O₂, en la formación de especies reactivas de oxígeno (RO's), como el radical hidroxilo, que actúa como agente oxidante difusible (Guillén et al., 2000). Por otro lado, podrían ejercer una función protectora, facilitando la polimerización de RO's producidas durante el proceso de degradación de la lignina y así proteger al hongo de la acción de estos radicales (Thurston, 1994).

1.4.2 Propiedades bioquímicas de las lacasas

Las lacasas catalizan la eliminación de 1 electrón y 1 protón de grupos hidroxilo fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales fenoxilo y amino,

respectivamente (Leonowicz et al., 2001). Estas pueden oxidar numerosos compuestos como p-difenol, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, y aril diaminas (Yaropolov et al., 1994), presentando un potencial de oxidorreducción que varía entre 500 y 800 mV (Schneider et al., 1999; Xu et al., 2000; Wesenberg et al., 2003). Los productos iniciales de oxidación son bastante inestables, pudiendo generar reacciones espontáneas de hidratación y desprotonación, dando lugar a compuestos insolubles de tipo melanina (Thurston, 1994) o produciendo radicales que pueden reaccionar entre sí originando dímeros, oligómeros o polímeros covalentemente unidos mediante enlaces C-C, C-O y C-N (Claus, 2004). Estas enzimas también llevan a cabo reacciones de desmetilación en el polímero de lignina y sobre ácidos metoxifenólicos (Kirk et al., 1992).

Al contrario de otras oxidorreductasas, las lacasas oxidan directamente el O_2 a H_2O a través de un mecanismo de transferencia de 4 electrones. El amplio espectro de sustratos susceptibles de ser oxidados por las lacasas provoca que su cinética sea enorme, aunque solo unos pocos sustratos han sido tomados como modelos de oxidación por estas enzimas. Entre estos se encuentran el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), la siringaldizina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azina) o el 2,6-dimetoxifenol, que también pueden ser oxidados por peroxidasas en presencia de H_2O_2 (Claus, 2004).

La comparación del consumo de O_2 con la oxidación del sustrato reductor rinde una relación típica de 4 moléculas de sustrato por molécula de O_2 (Davies y Ducros, 2001).

1.4.3 Mecanismo catalítico de las lacasas

Estas glicoproteínas requieren de un oxígeno (O_2) para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, sustratos orgánicos por medio de la sustracción de 1 electrón transformándolo en H_2O_2 y radicales activos, se caracterizan por la presencia de varios átomos de cobre en su estructura, en estado Cu_2^+ de oxidación. Estos

átomos de cobre se agrupan en tres tipos diferentes de centros de cobre: tipo 1, 2 y 3. En estas enzimas, los diferentes centros de cobre actúan conduciendo electrones desde un sustrato reductor hasta el oxígeno molecular de una manera controlada, sin la formación de intermediarios tóxicos (Palmer et al., 2001; Páez, 2012). Esta reacción tiene lugar a través de 4 oxidaciones monoelectrónicas del sustrato catalizadas en el centro de Cu T1 (o cobre azul), el cual media la transferencia electrónica hasta el centro T2/T3, teniendo lugar la unión y reducción del oxígeno molecular a agua (McGuirl y Dooley, 1999; Davies y Ducros, 2001). Este primer paso de reducción del centro T1 por el sustrato constituye el paso limitante en el ciclo global de oxidorreducción de las lacasas, con respecto a la reducción del O₂, el centro trinuclear T2/T3, reducido completamente, reacciona con el oxígeno para dar lugar a un peróxido como intermediario, en un paso de reducción con 2 electrones, donde el átomo de cobre de tipo 2 y 1 de los átomos de cobre de tipo 3 se unen mediante un enlace hidropéroxido. Este intermediario se activa llevando a cabo una reducción adicional, dando lugar a un intermediario tipo nativo donde los 2 átomos de cobre anteriores están unidos mediante un producto tipo oxo o tipo hidroxilo (Solomon et al., 2001). La formación del intermediario nativo implica la ruptura del enlace O-O de la molécula de dióxígeno a través de la transferencia de 2 electrones (Palmer et al., 2001). Así, la reducción del oxígeno con 4 electrones tiene lugar a través de 2 pasos de reducción con 2 electrones cada uno. El último paso, el intermediario nativo se relajaría lentamente dando lugar a la enzima en estado de reposo (Rodríguez-Sánchez, 2006).

2. ANTECEDENTES

Si bien la mayoría de los trabajos de investigación respecto a la producción de enzimas lacasas, usos y modificación ha sido ampliamente descritas en hongos ligninolíticos (Basidiomicetos), caracterizados por mineralizar la lignina basados en la producción de radicales libres, principalmente por medio de las enzimas extracelulares lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa, sin embargo, otros trabajos proponen que también los hongos filamentosos (ascomicetos) pueden tener una producción importante de enzimas ligninolíticas, específicamente la enzima lacasa. Valdes (2018) evaluó el índice de potencia (IP) de enzimas lacasas, en un medio con ABTS empleando diferentes cepas de hongos basidiomicetos; *Ganoderma* sp; *Trametes* sp; *Cyathus* sp, y hongos filamentosos como *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp, este último fue utilizado como control positivo. Los resultados expusieron que *Cyathus* sp y *Ganoderma* sp difieren del resto de las cepas, pero no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0.0001$), seguido de *Trichoderma* sp a los 10 días (32.7×10^{-4} UI), *Cyathus* sp a los 7 días (16.48×10^{-4} UI) y *Trametes* sp a los 7 días (10.5×10^{-4} UI), siendo *Trichoderma* sp. el hongo con mayor índice de potencia de actividad enzimática de lacasas.

Ravelet et al. (2000) aislaron 41 cepas de hongos de suelos contaminados con Hidrocarburos Políciclicos Aromáticos (HAP), cuales fueron expuestos a una concentración de 10 mg/L^{-1} de las 41 especies aisladas 9 presentaron la capacidad de degradarlos, además de poder utilizarlos como fuente de carbono. Cabe resaltar que *T. harzianum* fue capaz de degradar 2.47 mg/L de HPA en 48 h.

Divya et al. (2013) realizaron una purificación de lacasa extracelular de *T. harzianum* Rifai (NFCCI 2745), para generar la oxidación del papel térmico catalizada por esta enzima para así, eliminar la propiedad estrogénica provocada por el BFA que es utilizado como revelador de color en dicho papel, esta reacción catalítica produjo un compuesto soluble en agua y otro insoluble. En este estudio la enzima lacasa eliminó la actividad estrogénica del papel térmico en un 20, 60 y 100% en 1, 2 y 3 h respectivamente, en este análisis se observó una reducción en

la concentración de compuestos fenólicos totales después de la incubación con lacasa.

Shin-Ya et al. (2002) evaluaron la efectividad de la enzima lacasa en el proceso de oxidación del BFA, transformándolo en isooctano. Presentándose con mayor efectividad en medios de cultivo a pH=5.

En 2010, Schuster y Schmoll mencionaron que las especies del género *Trichoderma* se han considerado como buenos sistemas para la expresión heteróloga de proteínas debido a que pueden realizar modificaciones postraduccionales en eucariotas, ya que son productores eficientes de enzimas extracelulares que degradan una gran variedad de sustratos e incluso compuestos xenobióticos. Complementando a lo ya descrito Kovacs et al. (2009) en algunas especies de hongos, como es el caso de *Trichoderma reesei*, el cual es utilizado para la producción industrial de celulasas y hemicelulasas (enzimas utilizadas en el ablandamiento de la pulpa de papel), además, en *Trichoderma atroviride* se ha demostrado que es un buen productor de celulasa, asimismo, Cazares-García et al. (2014) corroboraron lo anteriormente mencionado al realizar el análisis del genoma de *Trichoderma* en donde revelaron que en este género se contienen varios genes de fenoxidasas putativos, muchos de los cuales se expresan intracelularmente dependiendo de la especie, además esto puede favorecer su utilización en la degradación de compuestos fenólicos o aminas aromáticas.

Zafra et al. (2014) demostraron el potencial de *Trichoderma asperellum*, un hongo aislado de suelos contaminados del estado de Tlaxcala para ser utilizado en procesos de biorremediación, este trabajo es el primer informe que describe la participación de este hongo filamentoso ya que es capaz de tolerar concentraciones de hasta 900 mg/L de (HAPs).

Bhosle y Thore (2016) realizaron un estudio en donde expusieron 4 especies de hongos: *Trichoderma viride*, *T. koningii*, *Penicillium chrysogenum* y *Rhizopus*

stolanifer al 2,4-D bajo concentraciones de 300 mg/L, 600 mg/L y 900 mg/L , su degradación se evaluó midiendo la reducción de la concentración de pesticida en los cultivos con un método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), los resultados indicaron que la totalidad de las especies tienen la capacidad de degradar a este compuesto además de utilizarlo como fuente de carbono, en el caso de *Trichoderma viride* fue capaz de degradar en un 59.99%, 59.47% y 04.83% de este compuesto, respectivamente.

Hongyan et al. (2019) realizaron un estudio en el que midieron la interacción entre el BFA y la enzima lacasa, producida y obtenida de *Trametes versicolor* mediante simulación de acoplamiento molecular, además evaluaron la degradación catalítica de BFA utilizando la solución enzimática en crudo. Las condiciones óptimas de degradación se obtuvieron mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM). Analizando los productos de transformación después de 3 y 6 h de reacción mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas (GC-MS). Los resultados muestran que la reacción entre lacasa y BFA fue espontánea, y la tasa de degradación en 24 h alcanzó el 88.76%. Los resultados de RSM mostraron que se alcanzó la máxima tasa de degradación a una concentración de 5 mg/L de BFA del 97.68% después de 1 h de reacción a 44.6 °C, con un pH de 5.2. De los productos intermedios generados por la catálisis del BFA a través de la acción enzimática de la lacasa, fueron hallados; etilbenceno, p-xileno y ciclohexanona 1-metil-4-isopropenil-2-ciclohexenol. El análisis de la degradación de BFA por la lacasa cruda de *T. versicolor* comienza a partir de los átomos de C entre dos anillos de benceno que conectan BFA.

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies del género *Trichoderma* son microorganismos de vida libre, simbioses de plantas y ampliamente utilizados como agentes de control biológico (Harman et al., 2004). Durante la interacción con las raíces de las plantas, confieren atribuciones benéficas entre las que destaca la promoción del crecimiento y aumento de la resistencia sistémica, ejerciendo efectos sobre el desarrollo y productividad de las plantas (Harman, 2006). Durante las primeras etapas de colonización *Trichoderma* spp. degrada la pared celular de las plantas, constituida principalmente por celulosa y hemicelulosa y cuya degradación esta mediada por la participación de enzimas hidrolíticas, estas logran ser de utilidad para el incremento en la actividad de xilanasas y celulasas encargadas de degradar celulosa y hemicelulosa de la biomasa vegetal para la bioproducción de compuestos de alto valor agregado (Van et al., 1998; Stricker et al., 2008). El uso de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico, se debe básicamente a su capacidad inductora de resistencia sistémica en plantas a diferentes patógenos, mediante mecanismos que implican la competencia por espacio y nutrientes, antibiosis y micoparasitismo, debido a esta característica, las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. Sin embargo, los estudios sobre su comportamiento y su efecto en ambientes terrestres y acuáticos contaminados han sido escasamente estudiados, y dado que *T. harzianum* es un hongo que pertenece a este género se requiere conocer su potencial para degradar distintas concentraciones del plastificante Bisfenol-A y así, poder ser empleado en la biorremediación de sitios contaminados con este xenobiótico.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar la degradación de diferentes concentraciones de BFA por *Trichoderma harzianum* crecido en un sistema de fermentación sumergida e identificar los productos generados durante este proceso.

4.2 Específicos

- Caracterizar los parámetros específicos de crecimiento de *T. harzianum* desarrollado bajo diferentes tratamientos con BFA utilizando un sistema de fermentación sumergida.
- Cuantificar el efecto con diferentes tratamientos de BFA en la producción y parámetros enzimáticos de lacasas de *T. harzianum* crecido en un sistema de fermentación sumergida.
- Analizar los intermediarios de la degradación de BFA por medio cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS).

5. HIPÓTESIS

El hongo *T. harzianum* crecido con distintas concentraciones de BFA empleando un sistema de fermentación sumergida degradará a este xenobiótico en subproductos fenólicos de menor toxicidad.

6. METODOLOGÍA

6.1 Microorganismo de estudio

La cepa utilizada como inóculo para la realización del trabajo fue *T. harzianum* adquirida en el Laboratorio de Algas Continentales, Taxonomía y Ecología de la UNAM, su conservación y propagación se realizó en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) a temperatura de 25 °C, en el Laboratorio de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

6.2 Desarrollo de la fermentación

6.2.1 Medio de cultivo líquido para los diferentes tratamientos

El crecimiento de *T. harzianum* se realizó en un medio de cultivo de glucosa y extracto de levadura (GYE) cuyos ingredientes se citan en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo de Glucosa y Extracto de levadura (GYE)* (Autoría propia).

Reactivo	g/L
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.6
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.5
Fosfato de Potasio dibásico (K ₂ HPO ₄)	0.4
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ -5H ₂ O)	0.25
Sulfato de Hierro (FeSO ₄ -7H ₂ O)	0.05
Sulfato de Manganeseo (MnSO ₄)	0.05
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	0.001

*pH ajustado a 4.5 con ácido láctico (C₃H₆O₃)

6.2.2 Esterilización e inocuidad de medio de cultivo empleado en la fermentación sumergida

Cada tratamiento (fermentación) tuvo una duración de 160 h, se emplearon 60 matraces Erlenmeyer de 125 mL, la toma de muestra se hizo cada 8 h para cada

uno de los tratamientos. A cada uno de los matraces de cada tratamiento se le adicionó 50 ml de medio de cultivo con sus respectivas concentraciones de BFA; [0] para el tratamiento control, 50 y 100 mL/L para los dos tratamientos empleados, posteriormente se esterilizaron por 15 min a 121 °C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (figura 5).



Figura 5. Matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio GYE para fermentación sumergida (autoría propia).

6.2.3 Siembra de inóculos de *T. harzianum* y desarrollo de la fermentación sumergida

Los matraces de cada tratamiento previamente estériles y fríos fueron inoculados con tres fragmentos (“pellets”) de 10 mm de diámetro cada uno, tomados de la periferia de las cajas Petri de la cepa de *T. harzianum* previamente propagadas en PDA, una vez realizada la inoculación se incubaron a 25 °C con agitación orbital a 120 rpm. Todos los tratamientos y análisis fueron realizados por triplicado, reportando la media y desviación estándar.

6.3 Obtención del extracto crudo enzimático (ECE)

A partir de 8 h después de iniciados los tratamientos se retiraron 3 matraces de la incubadora y así cada 8 h, de los matraces tomados por hora/muestreo se obtuvo el ECE por filtrado y retención de la biomasa utilizando un papel filtro (Whatman No. 4) empleando una bomba de vacío (marca FELISA-SCHUCO INC., modelo 5711130). Una vez obtenida la biomasa se deshidrató a 50 °C en un horno de secado (marca Terlab) hasta peso constante.

6.4. Evaluación de la velocidad específica de crecimiento

Para obtener los valores del progreso de la biomasa en función del tiempo $X = X(t)$ se ajustó la ecuación logística de Verhulst-Pearl:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right) X$$

La solución a la ecuación se presenta de la siguiente manera:

$$X = \frac{X_{m\acute{a}x}}{(1 + C e^{-\mu t})}$$

Donde:

μ = Máxima velocidad específica de crecimiento (g/h)

$X_{m\acute{a}x}$ = Valor de la biomasa máxima o de equilibrio (g/L) cuando $dX/dt = 0$ para $X > 0$.

t = Tiempo transcurrido en la fermentación (h).

X_0 = Valor de la biomasa inicial (g/L).

C = Valor que representa la relación entre la diferencia de $X_{m\acute{a}x}$ y X_0 (g/L).

$$C = \frac{(X_{m\acute{a}x} - X_0)}{X_0}$$

La estimación de los parámetros cinéticos en las ecuaciones antes mencionadas se llevó a cabo usando el programa Solver de Microsoft Excel (Viniegra-González et al., 2003).

6.5. Perfiles de pH

Durante el tiempo de tratamiento se determinaron los perfiles de pH, el cual se midió con un potenciómetro (marca HANNA, modelo HI 9811-5) directamente con el sobrenadante de cada uno de los tres matraces obtenidos por muestreo.

6.6 Determinación del consumo de glucosa como fuente de carbono asimilable

Se cuantificó el consumo de glucosa empleando la técnica de azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido dinitro-salicílico). Se mezclaron 100 μ L de sobrenadante conteniendo el extracto crudo enzimático, 900 μ L de agua destilada y 2 mL del reactivo DNS. La mezcla se sometió a baño María a una temperatura de 90 °C por 5 min, posteriormente se colocó en un baño de hielo para detener la reacción, después de enfriarse se leyó la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro UV/visible (marca JENWAY, modelo 6715). Previamente se preparó una curva de calibración con glucosa (Córdoba-Sosa et al., 2014a; 2014b).

6.7 Cuantificación de la actividad enzimática extracelular

6.7.1 Actividad enzimática de lacasas

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustrato el 2,6-dimetoxifenol (DMP), 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M y pH de 4.5. La mezcla de reacción (475 μ L de sustrato, 50 μ L de ECE) se incubó a 39 °C por 1 min. Se midió la absorbancia a 468 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (marca Jenway, modelo 6715) en donde una unidad de actividad de lacasas (U) será la cantidad de enzima que provoque incrementos de 1.0 unidad en la absorbancia por min de incubación (Pérez-Montiel et al., 2017).

6.7.2 Parámetros cinéticos enzimáticos

Una vez obtenido el extracto enzimático se calculó el rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) usando la relación entre la $E_{m\acute{a}x}$ (U/L) y $X_{m\acute{a}x}$ (g/L). La productividad enzimática ($P = E_{m\acute{a}x}/h$) se evaluó utilizando el tiempo (h) en el momento que la actividad fue la máxima ($E_{m\acute{a}x}$), esto además ayudó a calcular el pico máximo de actividad ($P_{RO} = E_{m\acute{a}x}/\text{Tiempo de fermentación}$). La tasa específica de formación de la enzima se calculó a partir de la siguiente ecuación (Ahuactzin-Pérez et al., 2016):

$$q_p = (\mu)(Y_{E/X})$$

Donde:

P_{RO} = Máxima productividad enzimática (U/h).

$E_{m\acute{a}x}$ = Enzima máxima (U/L).

q_p = Tasa específica de formación de la enzima.

μ = Velocidad específica de crecimiento (g/h).

$Y_{E/X}$ = Rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa (U/g).

6.8. Análisis de los subproductos de degradación de BFA en el ECE por Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS)

6.8.1 Preparación de las muestras

Las muestras analizadas fueron las correspondientes al tratamiento con 50 mg de BFA, se deshidrataron en un horno (marca Terlab®) a una temperatura de 50 °C durante 48 h, se resuspendieron con 1 mL de acetonitrilo grado HPLC (marca Meyer) e incubadas a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se agitó en Vortéx durante 1 min, cada una de las muestras tratadas fueron filtradas empleando filtros con poro de 25 μm de diámetro, el extracto se colocó en viales de 1.5 mL (marca Agilent).

6.8.2 Análisis de los sobrenadantes en GC-MS

Los productos intermedios de la biodegradación de BFA se analizaron en un Cromatógrafo de Gases (marca Agilent, modelo 7820^a) acoplado a un Espectrofotómetro de Masas 5977E (GC-MS, por sus siglas en inglés). Equipado con un detector de triple eje y una columna capilar Agilent (HP-5MS) con 5% de fenitrilo siloxano de metilo (325 °C, 30 m, 320 µm, 0.25 µm). Se inyectó una alícuota de 1 µL de las muestras, con una fuente de inyección (GC ALS) a una temperatura de puerto de 300 °C con la válvula de purga en modo dividido, utilizando una relación de división 20:1 y flujo dividido de 21.14 mL/min. El helio fue utilizado como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min, la temperatura del inyector fue de 280 °C, mientras que la del horno se mantuvo inicialmente a 60 °C durante 2 min, aumentó después a 120 °C durante 6 min y posteriormente a 280 °C durante 2 min. La interfaz GC-MS se mantuvo a 280 °C con 57.4 kpa. El análisis del espectro de masas se realizó a una energía de 70 eV, la carga de masa m/z comenzó a 40 y terminó con 400 m/z una duración de exploración de 0.50 s. Las estructuras de los productos de degradación se confirmaron comparando patrones de fragmentación de los espectros de masas con los de compuestos auténticos utilizando la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (**NIST**) V. 2.0. (Modificado y estandarizado de Vijayalakshmi et al. (2017)).

6.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se evaluaron los datos mediante un ANOVA de una vía y una prueba de intervalos múltiples (post hoc) de Tukey con un alfa de 0.05 utilizando el programa The Graph Pad Prism® program (San Diego, CA, USA) (Córdoba-Sosa et al., 2014a; 2014b).

7. RESULTADOS

7.1. Parámetros cinéticos evaluados durante el crecimiento de *T. harzianum* en FS

La biomasa producida (X) por la cepa de *T. harzianum* crecida en fermentación sumergida de cada uno de los tratamientos (0, 50 y 100 mg/L de BFA) tuvo una duración de 160 h, durante este tiempo *T. harzianum* mostró una curva típica de crecimiento microbiano dividido en tres etapas. La primera correspondió a la fase de adaptación que transcurrió durante las primeras 16 h de incubación para los tres tratamientos, seguida por la fase exponencial que en todos los tratamientos (control, 50 y 100 mg/L de BFA) terminó a las 64, 80 y 86 h, respectivamente. La duración de la fase exponencial fue mayor en los dos tratamientos con BFA con respecto al tratamiento control, la última etapa de crecimiento correspondió a la fase estacionaria, que en los tres tratamientos terminó a las 160 h de crecimiento (Figura 6).

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos de la cuantificación de los parámetros cinéticos de crecimiento. El valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) fue mayor en el tratamiento testigo (sin BFA) reportando 0.09 h^{-1} y en el caso de los tratamientos con 50 y 100 mg/L se obtuvieron valores de 0.05 y 0.06 h^{-1} , respectivamente, entre estos últimos valores no se observa diferencia significativa.

En el caso de la $X_{\text{máx}}$ en los tratamientos de 50 y 100 mg/L de BFA en los que se cuantificaron valores de 5.5 y 5.8 g/L, respectivamente, siendo estos los valores más altos reportados para este parámetro, a diferencia de lo cuantificado en el tratamiento testigo donde se obtuvo un valor de 5.0 mg/L.

Para el parámetro de rendimiento de la enzima ($Y=x/s$ (g_x/g_s)), fue mayor en el tratamiento con 100 mg/L de BFA con un valor de 0.73, en el caso de los tratamientos testigo y 50 mg/L de BFA se reportaron rendimientos de 0.60 y 0.64, respectivamente.

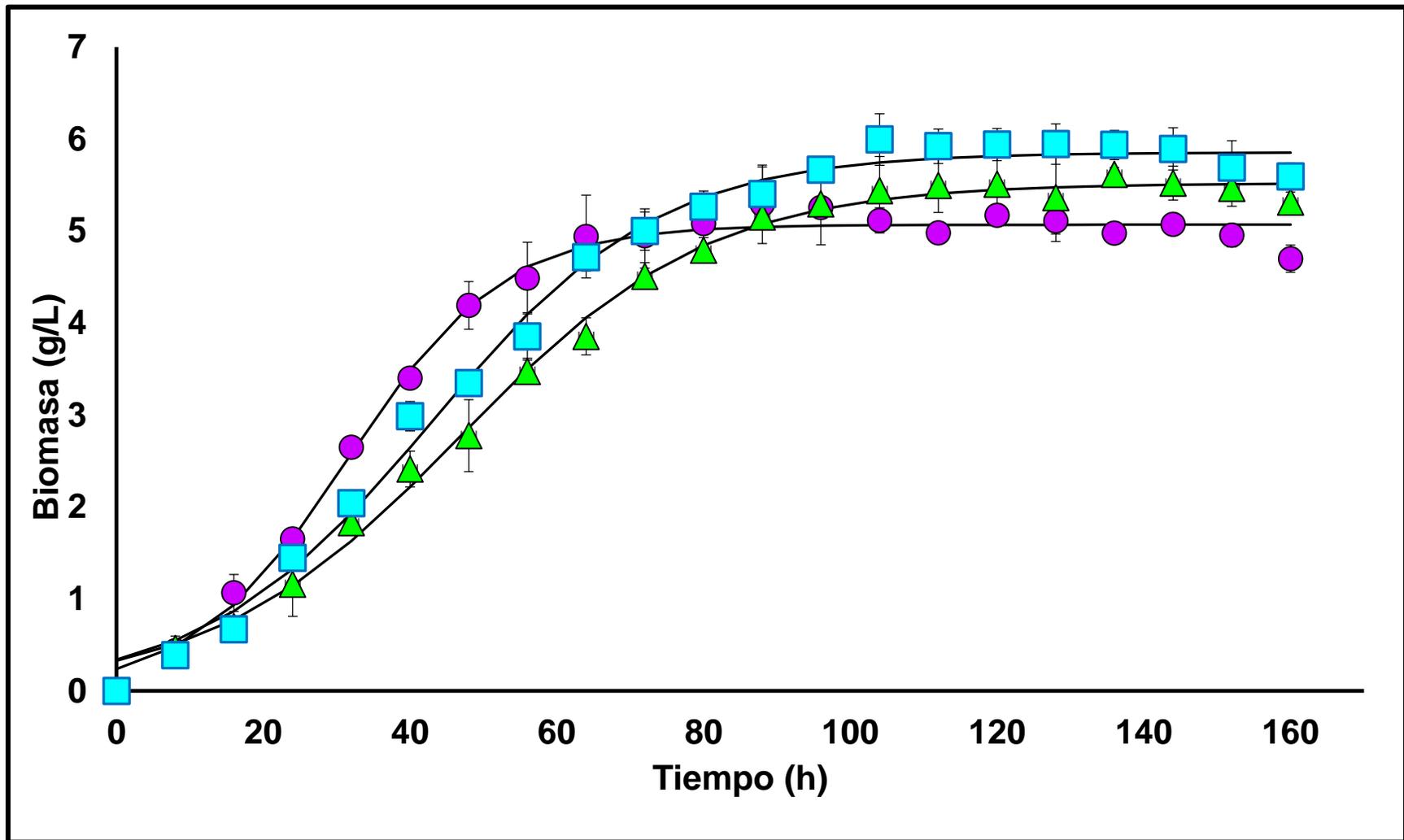


Figura 6. Producción de biomasa de *T. harzianum* en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *T. harzianum* crecido sobre BFA en FS

Parámetro	Medio de cultivo		
	0 mg/L de BFA	50 mg/L de BFA	100 mg/L de BFA
μ (h ⁻¹)	0.09 + 0.002 ^a	0.05 + 0.004 ^b	0.06 + 0.001 ^b
X _{máx} (g/L)	5.01 + 0.13 ^a	5.50 + 0.08 ^b	5.82 + 0.06 ^b
Y _{=X/S} (g _x /g _s)	0.60 ± 0.01 ^a	0.64 ± 0.04 ^a	0.73 ± 0.00 ^b

Se reportan la media y la desviación estándar.

Las medias del mismo renglón con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

7.2 Consumo de glucosa por *T. harzianum* en FS

En la Figura 7 se muestra el tiempo en el que *T. harzianum* utilizó la concentración inicial (10 g/L) de glucosa utilizada en los tres medios de cultivo (0, 50 y 100 mg/L de BFA), durante la fermentación; en el tratamiento testigo, *T. harzianum* el consumo de glucosa como fuente de carbono la inicio desde las primeras 8 h de fermentación; para el caso de los tratamientos con 50 y 100 mg/L de BFA, ésta comenzó a las 16 h de fermentación; en ambos tratamientos *T. harzianum* siguió la misma tendencia a consumir la glucosa al principio de la fase exponencial (Figura 7).

En el tratamiento testigo, *T. harzianum* consumió el 50% de la concentración inicial de glucosa en 32 h (5.0 g/L) y transcurridas 88 h de fermentación, el consumo fue al 100%, mientras que el tratamiento con 50 mg/L de BFA, *T. harzianum* solo consumió 6.6 g/L de glucosa en el mismo tiempo. En el tercer tratamiento (100 mg/L de BFA), el hongo consumió 6.3 g/L de la concentración inicial de glucosa en el medio en un promedio de 64 h de fermentación; el consumo de glucosa en los tratamientos en presencia de BFA se llevó a cabo en su totalidad a las 104 h de fermentación.

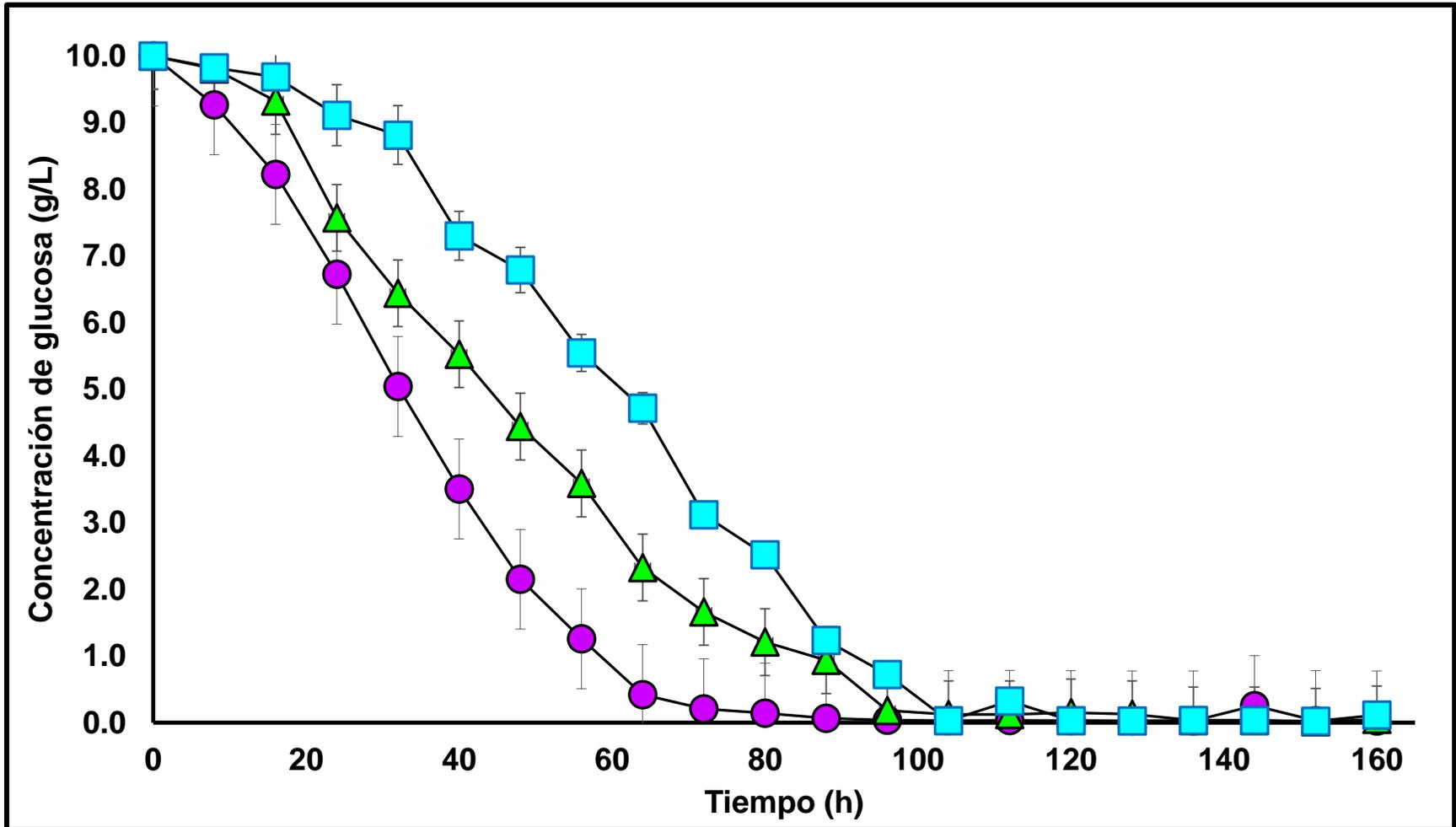


Figura 7. Consumo de glucosa por *T. harzianum* crecido en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS.

7.3 Análisis de los cambios de pH durante la fermentación de cada tratamiento

En la Figura 8 se muestra el perfil de pH de los sobrenadantes de la FS de cada uno de los tratamientos en el que creció *T. harzianum*, en los tratamientos control y con 100 mg/L de BFA se observó una acidificación del medio con respecto al pH inicial de crecimiento (4.5), mostrando valores de 3.9 y 4.1 respectivamente, sin embargo, a partir de las primeras 16 h de fermentación, para el caso del tratamiento con 50 mg/L de BFA se observó un ligero aumento de pH inicial siendo este de 4.6.

Posterior a las 16 h de fermentación, los tratamientos testigo y el de 50 mg/L de BFA mostraron pH ácidos (4.3 y 4.6 respectivamente) a 40 h de fermentación, para el caso del tratamiento de 100 mg/L de BFA el valor de pH a las 48 h fue de 3.8, considerado ácido. Cabe resaltar que a partir de las 40 h (tratamiento control y 50mg/L de BFA) y 48 h (tratamiento con 100 mg/L BFA) de fermentación, los sobrenadantes alcanzaron a las 160 h de fermentación valores de pH básico (7.7, 7.2 y 8.1 respectivamente).

7.4 Actividad extracelular de lacasas producidas por *T. harzianum* con diferentes tratamientos de BFA en fermentación sumergida

La Figura 9 muestra los perfiles de actividad de enzimas lacasas de *T. harzianum* en los 3 tratamientos realizados. En el tratamiento testigo se presentó la mayor actividad de lacasas a las 8 h de fermentación. *T. harzianum* presentó una actividad creciente (14 U/L), no obstante, esta actividad no se mantuvo y no hubo incrementos en la misma durante la fase exponencial. Durante la fase estacionaria se observó un incremento de 34.3 U/L de la actividad enzimática a las 80 h de fermentación, a pesar de ello la valor disminuyó a 31.4 U/L a las 88 h, pese a esto después se comenzaron a registrar incrementos hasta las 120 h de fermentación en el que se presentó la máxima actividad de enzimas lacasas con 44.8 U/L, posteriormente se observa un decremento en la actividad enzimática en este tratamiento.

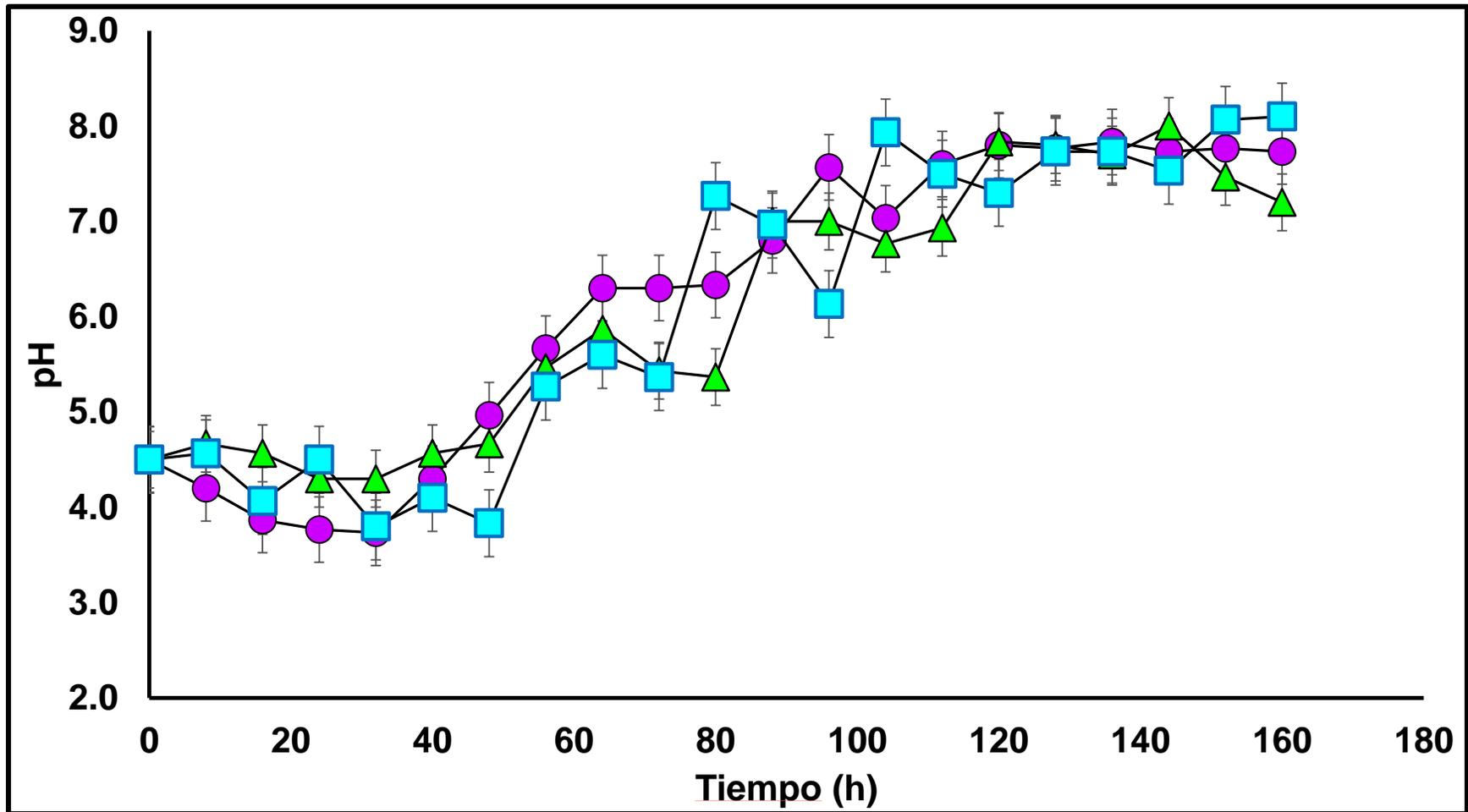


Figura 8. Perfiles de pH de los cultivos de *T. harzianum* crecido en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS.

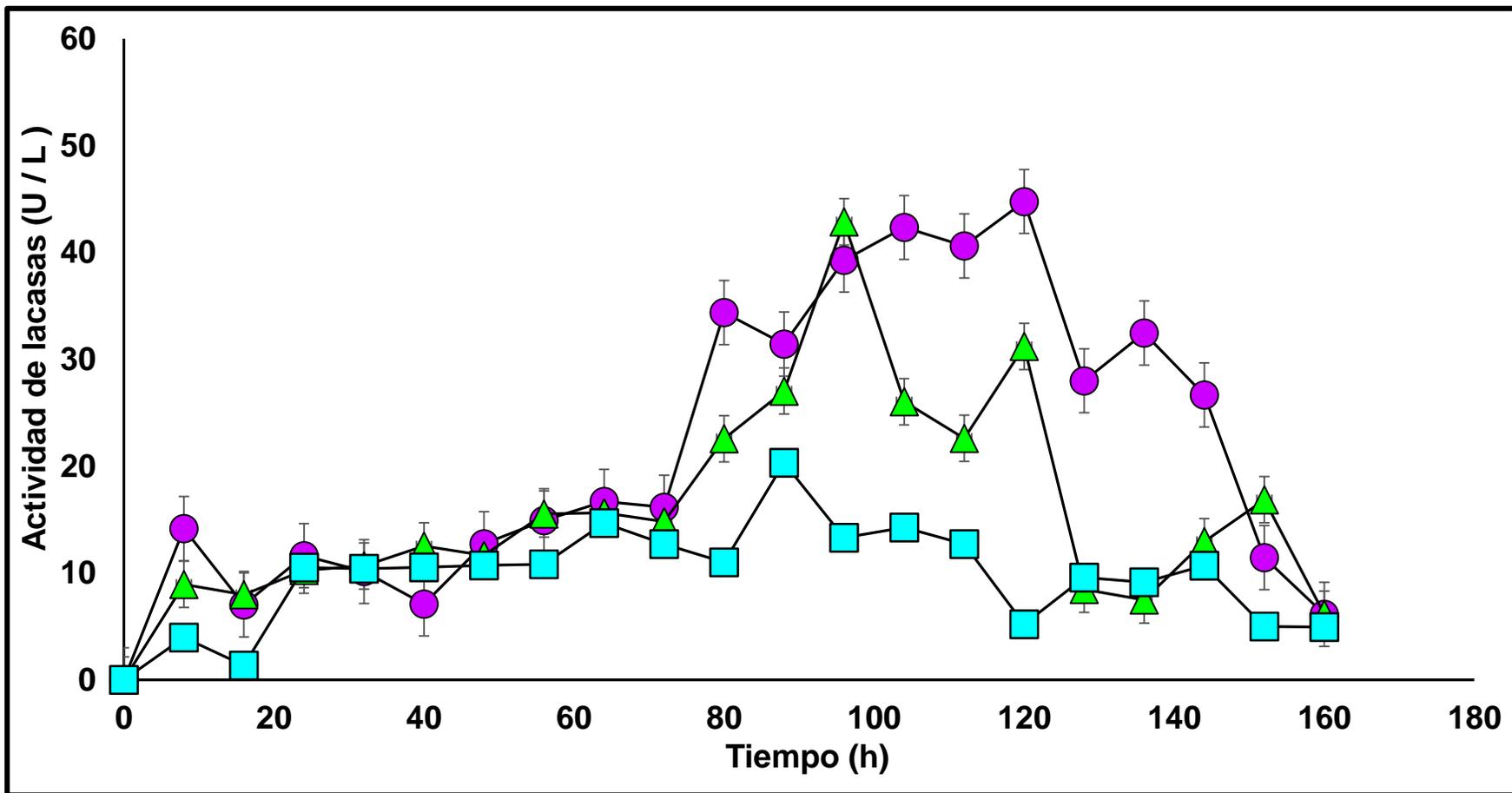


Figura 9. Actividad de enzimas lacasas producidas por *T. harzianum* crecido en 0 mg/L de BFA (Testigo) (●), 50 mg/L de BFA (▲) y 100 mg/L de BFA (■) en FS.

En el tratamiento con 50 mg/L de BFA durante la fase de crecimiento exponencial de *T. harzianum*, se observó que la actividad de lacasas en el intervalo de 16 a las 72 h se observan incrementos paulatinos de 7.9 a 12.7 U/L y fue hasta las 96 h de fermentación (fase estacionaria) donde se registró un valor de 42.8 U/L siendo esta la mayor actividad enzimática en este tratamiento.

En el caso del tratamiento con 100 mg/L de BFA comparado con los dos tratamientos anteriores, en éste se registró el pico con menor $E_{máx}$ (Tabla 3) y el perfil con menor actividad catalítica, en este tratamiento la mayor actividad de lacasas se dio a las 88 h (último punto de la fase exponencial) con un registro de 20.3 U/L.

7.5. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *T. harzianum* en los diferentes tratamientos en fermentación sumergida

La actividad máxima de enzimas lacasas se registró en el tratamiento testigo (0 mg/L de BFA) alcanzando un valor de 44.8 U/L. Mientras que en el tratamiento con 50 mg/L de BFA la $E_{máx}$ registrada fue de 42.9 mg/L inferior al anteriormente mencionado se reportó en el tratamiento con 42.9 U/L. Con respecto al tratamiento con 100 mg/L de BFA se registró la menor $E_{máx}$ comparada con los 2 tratamientos anteriores, siendo ésta de 20.3 U/L a las 88 h de fermentación (Tabla 3).

El rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa producida ($Y_{E/X}$) por *T. harzianum* fue mayor en el tratamiento con 50 mg/L de BFA, con 9.5 U de enzimas lacasas formadas por cada gramo de biomasa (U/g X), seguida del tratamiento testigo (0 mg/L de BFA) con 8.5 U/g X. No obstante, en el tratamiento con 100 mg/L de BFA se obtuvo el valor más bajo del $Y_{E/X}$ de 3.4 U/g X. Revelando así, que el medio en que se desarrolle *T. harzianum* tendrá efecto sobre la evaluación de este parámetro, aunado a esto, se encontró que la concentración de este compuesto tiene efecto en la determinación de este parámetro.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas de *T. harzianum* crecido en diferentes tratamientos de BFA en fermentación sumergida.

Parámetro	Tratamiento		
	0 mg/L de BFA	50 mg/L de BFA	100 mg/L de BFA
$E_{m\acute{a}x}$ (U/L)	44.8 ± 1.95 ^a	42.9 ± 8.3 ^b	20.3 ± 1.0 ^c
$Y_{E/X}$ (U/g X)	8.5 ± 0.1 ^a	9.5 ± 7.0 ^b	3.4 ± 0.1 ^c
P_{RO} (UL/h ⁻¹)	0.43 ± 0.04 ^a	0.48 ± .037 ^a	0.23 ± 0.01 ^b
q_p (Uh/gX)	84.6 ± 19.8 ^a	128.5 ± 84.0 ^b	51.1 ± 6.1 ^c

Se reportan la media y la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

El tercer parámetro evaluado corresponde a la productividad (P_{RO}), el valor más alto registrado entre los tratamientos fue en el de 50 mg/L de BFA con 0.48 U/L/h⁻¹, seguido del obtenido en el tratamiento testigo con 0.43 U/L/h⁻¹. El valor más bajo de productividad de la enzima fue calculado para el tratamiento con 100 mg/L con 0.23 U/L/h⁻¹. Los valores de este parámetro no mostraron diferencias significativas entre el tratamiento testigo y el de 50 mg/L de BFA, sin embargo, la P_{RO} de estos dos tratamientos si tuvo diferencias significativas con el de 100 mg/L de BFA.

Respecto a la tasa específica de formación de enzima lacasa (q_p), el valor mayor se obtuvo en el tratamiento de 50 mg/L siendo de 128.5 U/g X/h⁻¹, por debajo de éste se registraron valores de 84.6 y 51.1 U/g X/h⁻¹ para los tratamientos de 0 (testigo) y 100 mg/L de BFA, respectivamente, siendo este último tratamiento el que registró los valores más bajos de cada uno de los parámetros cinéticos de producción de enzimas lacasas por *T. harzianum* en FS comparado con los otros dos tratamientos.

7.6. Identificación por GC-MS de intermediarios de la degradación de BFA por *T. harzianum* en fermentación sumergida

Se analizaron 20 muestras por GC-MS las cuales correspondieron a las etapas de muestreo de la fermentación con 50 mg/L de BFA. En la tabla 4 se muestran los 35 compuestos encontrados (incluido el BFA), productos y/o intermediarios de la

degradación de BFA por *T. harzianum* en FS, así como la fórmula química y tiempos de retención (R_t) de cada uno de éstos.

Se observa una gran variedad de compuestos fenólicos entre los que destacan el D-Limoneno, γ -Terpineno, Careno, Fenol, Benzofenona, Ciclohexanona y Bisfenol-A, los cuales fueron detectados desde la primera etapa de muestreo (8 h de fermentación) con un R_t de 6.222; 6.675; 7.128; 17.455; 19.552; 25.843 y 25.852, respectivamente. El BFA fue detectado a partir de la muestra correspondiente a las 64 h de fermentación (dentro de fase de crecimiento exponencial). A pesar que todos los compuestos encontrados en este estudio son relevantes, es importante resaltar la presencia de Tricetina ($R_t= 12.489$), compuesto sintetizado a partir del Glicerol ($R_t= 12.480$) tratándose de uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo para el ciclo de Krebs y también aparece como un producto intermedio en la fermentación alcohólica.

En la muestra correspondiente a las 96 h de fermentación donde se registró la Emáx fueron encontrados: Glicerol, Ácido propanoico, Naftaleno, Benceno y Ciclohexanona con $R_t= 12.480$; 19.082; 20.886; 25.231 y 25.843, respectivamente.

Los compuestos encontrados durante la fase de crecimiento exponencial de las 16 a las 82 h de fermentación fueron Glicerol: 12.480; Ácido propanoico:19.082;1-2-Difenilciclopropano: 21.070; Dodecilbenceno: 21.339; Benceno, (5-iodopentil): 25.231; D-Limoneno: 6.222; γ -Terpineno:6.675; Etoxiacetato de etilo: 2.976; 1,3-Propanediol: 2.976; 2-hidroxi-2-metilpropiofenona:10.585; Triacetin:12.489; 1-Dodecanol: 16.583; Fenol: 17.455; Benzofenona: 19.552; Benceno: 25.231; Fitano: 20.777; 2,2'-metilenbis(4-etil-6-terc-butifenol): 28.687; Naftaleno: 20.777;1-2-Difenilciclopropano: 21.070; 1,3-dimetil-2-fenoxibenceno: 20.903; Ciclohexanona: 25.843.

Los compuestos restantes fueron encontrados durante la última fase de latencia de *T. harzianum* los cuales corresponden al D-Limoneno: 6.222; γ -Terpineno:6.675;

Glicerol: 12.480; Ácido propanoico:19.082; Benceno, (5-iodopentil):25.231;
Benceno: 25.231; Ciclohexanona: 25.843; 1,3-Propanediol: 2.976; Careno:7.137;
Triptamina: 22.346; 1-peptona,4,4-dimetil-1,-3difenil: 24.854; Fenol: 17.455; 1,3-
dimetil-2-fenoxibenceno: 20.903; Tridecanol,2-etil-2metil: 20.768; 2-Dodecanol:
18.50; Benzonona: 19.552; 2-(benciloxi)etil metil carbonato: 21.976; Ácido fórmico:
16.582;

Tabla 4. Listado de compuestos identificados en los sobrenadantes del proceso de crecimiento T. *harzianum* en presencia de BFA analizados por GC-MS

#	Nombre del compuesto	Fórmula química	Tr
1	Etoxiacetato de etilo	C ₃ H ₁₂ O ₃	2.976
2	1,3-Propanediol	C ₃ H ₈ O ₂	2.976
3	Ácido 2-amino-5-metilbenzoico	C ₈ H ₉ NO ₂	4.304
4	D-Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	6.222
5	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	6.675
6	Careno	C ₁₀ H ₁₆	7.137
7	2-hidroxi-2-metilpropiofenona	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	10.585
8	Glicerol	C ₇ H ₁₂ O ₅	12.480
9	Triacetin	C ₉ H ₁₄ O ₆	12.489
10	Ácido fórmico	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	16.582
11	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	16.583
12	Fenol	C ₁₄ H ₂₂ O	17.455
13	2,4-i-tert-butilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	17.455
14	Decilubiquinona	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	17.455
15	2-Dodecanol	C ₁₀ H ₂₂ O	18.050
16	Ácido propanoico	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	19.082
17	Benzofenona	C ₁₃ H ₁₀ O	19.552
18	1,3-Difenilpropano	C ₁₅ H ₁₆	19.904
19	Tridecanol,2-etil-2metil	C ₁₆ H ₃₄ O	20.768
20	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	20.777
21	Naftaleno	C ₁₆ H ₁₆	20.886
22	1,3-dimetil-2-fenoxibenceno	C ₁₄ H ₁₄ O	20.903
23	Dibenzoanato de dipropilenglicol	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	20.970
24	Fenantieno,9,10-dihidroxi-1-metil	C ₁₅ H ₁₄	21.070
25	1-2-Difenilciclopropano	C ₁₅ H ₁₄	21.070
26	Dodecilbenceno	C ₁₈ H ₃₀	21.339
27	2-(benciloxi)etil metil carbonato	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	21.976
28	Triptamina	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	22.346
29	Flavano	C ₁₅ H ₁₄	24.845
30	1-peptona,4,4-dimetil-1,-3difenil	C ₁₉ H ₂₂ O	24.854
31	Benceno, (5-iodopentil)	C ₁₁ H ₁₅ I	25.231
32	Benceno	C ₁₁ H ₁₅	25.231
33	Ciclohexanona	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃	25.843
34	2,2-bis (4-hidroxifenil) propano	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	25.853
35	2,2'-metilenbis(4-etil-6-terc-butifenol)	C ₂₅ H ₃₆ O ₂	28.687

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó a *Tichoderma harzianum* como un microorganismo con potencial para biodegradar a Bisfenol-A, puesto que esta especie ha sido ampliamente utilizada en la producción e industria agrícola como controlador de algunas especies de hongos fitopatógenos. Sin embargo, los estudios relacionados con la interacción de este género fúngico con los contaminantes orgánicos e inorgánicos, , con el fin de evaluar su potencial como agente biológico aplicado a sistemas de biorremediación en sistemas terrestres y acuáticos contaminados.

8.1 Efecto del BFA en el crecimiento de *T. harzianum*

Ramírez-Mendoza (2018) evaluó μ , $X_{m\acute{a}x}$ y $Y(x/s)$ como parámetros cinéticos de crecimiento de *Aspergillus fumigatus* en concentraciones de 0, 50 y 75 mg/L de BFA, similares a las concentraciones empleadas en este trabajo (0, 50 y 100 mg/L BFA), este autor al igual que este trabajo se reportó, que los parámetros evaluados tuvieron valores más altos en los tratamientos con BFA comparado con el testigo, a excepción de la μ reportada en esta investigación que fue mayor el tratamiento testigo con un valor de 0.09. Ramírez-Mendoza (2018) reportó 0.1 en la μ , en ambos casos, para el tratamiento testigo con *A. fumigatus* y *T. harzianum* se reportaron las mismas velocidades específicas de crecimiento en el medio GYE. Ferro et al. (2013) evaluaron la degradación de 50 y 100 mg/L de BFA por bacterias de lodos activados, con éstas concentraciones se obtuvo una $\mu = 0.034$ y 0.030 , respectivamente, en este caso se mostró que la concentración de BFA limita el crecimiento de las bacterias, a diferencia a lo encontrado en este trabajo, con las mismas concentraciones de BFA, los valores observados fueron de $\mu = 0.05$ y 0.06 , respectivamente, evidenciando en este trabajo que la concentración de BFA propicia un crecimiento más alto conforme la concentración del xenobiótico va en aumento. Asimismo, Ahuactzin-Pérez et al. (2014) creció a *T. harzianum* bajo concentraciones de 500 y 1000 mg/L de Dibutil ftalato (DBF, que al igual que el BFA es utilizado en la industria plastificante) reportando una velocidad de crecimiento de $\mu = 0.56$ y 0.57 , respectivamente. Por lo anterior se amplió la gama de compuestos xenobióticos en los que se puede desarrollar este hongo, al igual que en el nuestro,

el crecimiento de este hongo aumenta conforme se incrementan las concentraciones del xenobiótico. Respecto a la producción de biomasa, Ramírez-Mendoza (2018) reportó una $X_{m\acute{a}x} = 6.4$ g/L en un tratamiento con 50 mg/L de BFA, este resultado es muy similar al encontrado en el presente estudio siendo $X_{m\acute{a}x} = 5.50$ g/L, en ambos trabajos se revela que la producción de biomasa está relacionada con la fuente de carbono en el medio donde se desarrolle este hongo filamentoso, esta relación había sido reportada por Al-Taweil et al. (2009), comprobando que el aumento de la biomasa de *T. viride* en fermentación sumergida va de entre 7 y 13 g/L y esta producción es directamente proporcional a la fuente de carbono depositada en el medio de cultivo (10, 45 y 80 g/L de glucosa), además es importante señalar que el *T. harzianum* consumió el 100 % de la concentración glucosa inicial a las 88 h de fermentación en el medio testigo y en los tratamientos con BFA el consumo de toda la fuente de carbono se observó antes de las 120 h de fermentación. Ahuactzin-Pérez et al. (2018) reportaron que el consumo de glucosa por *Pleurotus ostreatus* crecido en 500 y 1000 mg/L de DBP fue lenta en comparación con el tratamiento testigo (0 mg/L de DBT) donde el consumo total de glucosa fue a las 360, 384 y 456 h⁻¹ en FS.

8.2 Efecto del BFA en la producción y actividad enzimática de lacasas

Pérez-Montiel (2017) reportó una producción de enzimas lacasas por *P. ostreatus* crecido en medios con 50 y 75 mg/L de BFA, en el tratamiento de 50 mg/L de BFA presentó un incremento significativo de actividad a las 264 h de crecimiento con una actividad de 151 U/L, observando que durante las horas anteriores se obtuvieron actividades menores a 10 U/L. La mayor actividad en este medio fue de 159 U/L a las 288 h, con respecto al tratamiento con 75 mg/L de BFA se vio una actividad inicial de 70 U/L a las 240 h, posteriormente aumentó a las 312 h con una actividad de 219 U/L, finalizando la actividad máxima a las 336 h con 238 U/L. Ramírez-Mendoza (2018) con las mismas concentraciones reportó un valor de 67.6 U/L a las 108 h de crecimiento de *A. fumigatus* en el tratamiento con 50 mg/L de BFA, observando que durante las horas anteriores los valores fueron menores a 27.6 U/L,

la mayor actividad en este tratamiento fue de 167.8 U/L a las 144 h. En el caso del tratamiento con 75 mg/L de BFA se registró una actividad inicial de 7.8 U/L a las 36 h, posteriormente aumentó a 195 U/L, siendo este el valor de la máxima actividad durante las 72 h, disminuyendo de manera uniforme para finalizar a las 240 h con 4.6 U/L. En el tratamiento con 50 mg/L de BFA la actividad enzimática de *T. harzianum* comenzó desde las 8 horas de fermentación y presentó incrementos significativos hasta después de las 76 h aproximadamente, contrario a los trabajos ya citados, mientras que en el tratamiento con 100 mg/L de BFA la actividad de esta enzima se redujo drásticamente.

8.3 Efecto del pH en la producción y actividad enzimática

El efecto del pH en la producción de lacasa es limitado. El valor óptimo del pH varía según el sustrato, diferentes sustratos causan distintas reacciones para las lacasas. Diversos informes sugieren que el perfil en forma de campana se produce en caso de actividad de lacasa. A un valor de pH ácido, la diferencia de potencial entre el sustrato fenólico y el cobre T1 puede aumentar la oxidación del sustrato, mientras que el anión hidróxido (OH⁻) se une al centro de cobre T2 / T3. Estos efectos nos ayudan a determinar el valor óptimo de pH para la enzima lacasa, Cordi et al. (2007) usó siringaldazina como sustrato y determinó el efecto del pH sobre la actividad enzimática en un intervalo de 3.0 a 8.0. El pH óptimo para L1 (isoenzima de lacasa) fue de 4.0, mientras que el pH óptimo para L2 fue de 5.0. Han et al. (2005) apreciaron que la mostraban actividad enzimática de *Trametes versicolour* en un amplio rango de pH, determinando que la actividad óptima fue a pH = 3.0. Ramírez-Mendoza (2018) reportó una Emáx de 6.4 U/L de *A. fumigatus* con un pH= 7.5 a las 144 h de fermentación con 50 mg/L BFA, en ambos casos, los experimentos registran mayor actividad de enzimas lacasas en pH neutro y básico. A diferencia de la lacasa extraída de *Stereum ostrea* que mostró la mayor actividad a pH = 6.0 (Valeriano et al., 2009).

8.4 Degradación de BFA

Se han hecho algunos trabajos sobre la degradación de BFA a través de distintos métodos biológicos, físicos y químicos. Han et al. (2015) utilizaron ferrato (VI) como método químico para la degradación de BFA, encontrando e identificando 12 compuestos intermedios, permitiéndoles inferir una propuesta de posibles vías para la degradación de BFA por oxidación de ferrato (VI). Para la primera vía se reportan al (2-metil-1-fenil-1-propenil) benceno, (1-metil vinil) benceno y estireno, 2-fenilpropenal, 1,4-pentadien-3-cetona y ácido maleico, y para la segunda vía se reportan p-isopropilfenol, p-isopropenilfenol, isopropanol 2-fenilo, 1- (4-metilfenil) etanona, hidroquinona, benzoquinona, 1,4-pentadien-3-cetona y ácido maleico.

Otro método que se ha utilizado para la degradación de BFA es el de fotocátalisis (método físico) reportado por Kondrakov et al. (2014), donde se identificaron 7 subproductos de degradación: BFA catecol, BFA dicatcol, derivados de quinona de BFA, dicatcol de BFA, 4,4'-(1-hidroxietano-1,1-diil) dicatcol, 4,4'-etano-1,1-diildicatcol y 4-(2-hidroxiopropan-2-il) catecol; de estos 7 subproductos los derivados de quinona de BFA como el reportado en este estudios están catalogados como son productos genotóxicos.

A pesar de que los 2 métodos anteriormente mencionados degradan el BFA muchas veces el activar estos tipos de métodos conllevan a emplear un alto valor energético además de poner en riesgo al personal operativo, en el caso del trabajo de Kondrakov et al. (2014) revelaron que el proceso fotocatalítico de degradación de BFA puede generar productos aún más tóxicos.

Investigaciones respecto a la degradación de BFA por un organismo o agente de origen biológico como la hecha por Vijayalakshmi et al. (2017) al igual que esta investigación promete ser la tecnología más apropiada en la eliminación de este xenobiótico, Vijayalakshmi et al., (2017). Evaluó los intermediarios de la gradación de BFA por *Pseudomonas aeruginosa* revelando la presencia de fenol, acetofenona, hidroquinona, ácido p-hidroxibenzoico y BFA, de estos cuatro metabolitos diferentes

involucra diferentes tipos de vías metabólicas durante la degradación del BFA. Daási et al. (2016) también reportaron una ruta de degradación de BFA por enzimas lacasas de *Coriolopsis gallica* descubriendo seis subproductos de degradación de BFA mediados por esta enzima son 1-hidroxibenzotriazol (HBT), Ácido piroglutámico, Ácido tartárico, Ácido hidrocínámico, Ácido 3-fenil-3-hidroxipropanoico, ácido b-hidroxibutírico. A diferencia de los trabajos anteriormente mencionados, en nuestra investigación se identificaron 35 subproductos generados de la degradación del BFA, como resultado relevante de este trabajo es el reportar nuevos subproductos de la degradación de BFA ha reportado, de los subproductos encontrados en este trabajo y reportado también por Ahuactzin-Pérez et al (2018) en la propuesta de ruta de biodegradación DBP por enzimas lacasas es el benceno, este es oxidado por NADH deshidrogenasa transformándolo a catecol que a su vez por la interacción de una oxidasa lo transforma a ácido micónico, en los casos de benzofenona puede ser oxidado a ciclohexanona a su vez esta se transformado en fenol y finalmente a benceno (Han et al., 2015; Vijayalakshmi et al., 2017) o a D-Limoneno y/o γ -Terpineno (Kolvenbach et al., 2007).

9. CONCLUSIÓN

Los datos experimentales mostraron que el BFA tuvo efecto sobre los parámetros de crecimientos de *T. harzianum* crecido en FS, siendo estos mayores en los tratamientos con este xenobiótico, el efecto también es notorio en la producción y actividad enzimática de lacasas debido a que en el tratamiento de 100 mg/L los valores de dichos parámetros fueron menores comparados con los otros dos tratamientos empleados en esta investigación.

Respecto al consumo de glucosa como fuente inicial de carbono en cada uno de los tratamientos con BFA, el consumo fue más lento comparados con el testigo, sin embargo se dio en su totalidad en cada uno de los tratamientos, el BFA es utilizado por *T. harzianum* como una fuente secundaria de carbono, esto se respalda con el análisis de los 34 intermediarios de degradación registrados que incluyen compuestos fenólicos (compuestos menos tóxicos que el BFA) y compuestos orgánicos como el glicerol, uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos.

10. REFERENCIAS

- Adrio, J.L. y Demian, A.L. 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6: 191–199.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuítl-Beristain, S., García-Dávila, J., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruíz, M. C. y Sánchez, C. 2016. Degradation of di (2-ethyl hexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling pathway base on quantum chemical modeling. *Science of the Total Environment*.1186-1193.
- Ahuactzin-Pérez, M., Torres, J. L., Rodríguez-Pastrana, B. R., Díaz-Godínez, R., Díaz, R., Tlecuítl-Beristain, S. y Sánchez, C. 2014. Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the basis of fungal and bacterial growth. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 30(11): 2811-2819.
- Alexander, M. 1980. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. México: AGT Editor,S.A.
- Alexopoulos, C. J. y Mims, C. W. 1979. *Introductory Mycology*. 3ªed. Nueva York, Willey.
- Al-Taweil,H. I., Osman, M. B., Hamid, A. A. y Wan W. H. 2009. Optimizing of *Trichoderma viride* Cultivation in Submerged State Fermentation. *American Journal of Applied Sciences*. 6(7): 1284-1288.
- Barceló, D. y López, M. J. 2007. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P. y Cerniglia, C. E. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2554-2559.
- Bhosle, N. P. y Thore, A. S. 2016. Biodegradation of the Herbicide 2,4-D by Some Fungi. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 10: 1666-1671.

- Braun, J. M., Kalkbrenner, A. E., Calafat, A. M., Bernert, J. T., Ye, X., Silva, M. J., Barr, D. B., Sathyanarayana, S. y Lanphear, B.P. 2011. Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 119:131-137.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J. y Martínez, A. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 1775-1784.
- Careghini A, Filippo A, Saponaro, S. y Sezenna, E. 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ Sci Pollut Res* 22:5711–5741.
- Cazares-Garcia, S. V., Vazquez-Garciduenas, S. y Vazquez-Marrufo, G. 2014. Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a bioinformatic approach. *PloS one.* doi: 10.1371/journal.pone.0055295
- Chen, J. y Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. *Mycol Res.* 111:635-52.
- Chet, I.; Benhamou, N. y Haran, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. pp. 153–169. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Eds.). Tylor & Francis. Inc. Bristol, PA. USA.
- Choi, Y. J. 2017. Aerobic Soil Biodegradation of Bisphenol (BPA) Alternatives Bisphenol S and Bisphenol F Compared to BPA. *Environmental Science & Technology*, 13698–13704.
- Claus, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179:145-150.
- Claus, H. 2004. Laccase: structure, reactions, distribution. *Micron.* 35:93-96.
- Cordi, L., Minussi, R. C., Freire, R. S. y Durán, N. 2007. “Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement,” *African Journal of Biotechnology*, vol.6, no. 10, pp. 1255–1259.
- Córdoba-Sosa, G.; González-Márquez, A.; Ahuactzin-Pérez, M.; Torres, J. L.; Díaz-Godínez, G.; Díaz, R. y Sánchez, C. 2014^a. Growth of the edible mushroom

- Pleurotus ostreatus* on different concentrations of di(2-ethyl hexyl) phthalate in solid and in liquid media. 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, New Delhi, India, pp. 231–237.
- Córdoba-Sosa, G.; Torres, J. L.; Ahuactzin-Pérez, M.; Díaz-Godínez, G.; Díaz, R. y Sánchez, C. 2014^b. Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di(2- ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. JCBPS 4, 96–103.
- Corrales, J.; Kristofco, L. A.; Steele, W. B.; Yates, B.S.; Breed, C.S.; Williams, E.S. y Brooks, B. W. 2015. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. International Dose-Response Society.
- Cruger, W., Cruger, A. 1993. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Davies, G. J. y Ducros, V. 2001. Laccase. En: Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. y Wieghardt, K. (Eds). Handbook of metalloproteins. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester, West Sussex.
- De la Rubia, T., Ruíz, E. y Pérez, J. 2002. Properties of laccase produced by *Phanerochaete flavid-alba* induced by vanillin. Archives of Microbiology. 179:70-73.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P. y Giudice, L. C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine Society. 30. 293-342.
- Dittmer, N. T; Suderman, R. J; Jiang, H; Zhu, Y., Gorman, M. J., Kramer, K. J., y Kanost, M. R. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccaselike multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Biochem. Mol. Biology 34:29-41.
- Divya, L. M., Prasanth, G. K. y Sadasivan, C. 2013. Elimination of Estrogenic Activity of Thermal Paper Using Laccase from *Trichoderma* sp NFCCI-2745. Appl. Biochem Biotechnol. 169:1126–1133.

- Domsch, K., Gams, H. W. y Anderson, T. 1993. Compendium of soil fungi. IHV-Verlag.
- Eggen, T.; Moeder, M. y Arukwe, A. 2010. Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants. En: Science of the Total Environment. Vol. 408. N° 21. p. 5147-5157.
- Escudero, J., Daza, Z., Gil, N. y Mora, O. 2013. Evaluación de las enzimas celulíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. Colomb. Biotecnol. 1:108-117.
- Fazenda, M., Seviour, R., McNeil, B. y Harvey, L. 2008. Submerged culture fermentation of higher fungi: the macrofungi. Adv Appl Microbiol. 63:33-92.
- Ferro Orozco, A. M., Lobo, C. C., Contreras, E. M. y Zaritzky, N. E. 2013. Biodegradation of bisphenol A (BPA) in activated sludge batch reactors: analysis of the acclimation process. Int. Biodeter. Biodegr. 85: 392-399.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S. y Wallace, E. 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. J Environ Manage. 104:19-34.
- Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Barber, L. B. y Thurman, E. M. 2008 A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States II. Untreated drinking water sources. Sci Total Environ 402(2-3):201-216.
- Geens, T., Neels, H. y Covaci, A. 2012. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. Chemosphere. 87:796-802.
- Gray, H. B; Malmström, B. G. y Williams, R. J. P. 2000. Copper coordination in blue proteins. J. Biol. Inorg. Chem. 5:551-559.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. 2000. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 383:142-147.

- Han, M. J., Choi, H. T. y Song, H. G. 2005. "Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*," Journal of Microbiology, vol. 43, no. 6, pp. 555–560.
- Han, Q., Wang, H., Dong, W., Liu, T., Yin, Y. y Fan, H., 2015. Degradation of bisphenol A by ferrate (VI) oxidation: kinetics, products and toxicity assessment. Chem. Eng. J. 262: 34-40.
- Harman, G. E. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96, 190-4. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2, 43-56.
- Hernández, A. 2003. Microbiología Industrial. Costa Rica: Ed. EUNED.
- Hesseltine, C. 1976. Solid state fermentations. Biotechnol Bioeng. 14:517–32.
- Hidalgo, A. 1989. Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica.
- Hongyan, L., Zexiong, Z., Shiwei, X., He, X., Yinian, X., Haiyun, L. y Zhongsheng, Y. 2019. Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking. Chemosphere. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.143>.
- Huang, Y.Q., Wong, C.K.C., Zheng, J.S, Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L. y Wong, M.H. 2011. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. Environment International. doi:10.1016/j.envint.2011.04.010.
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S. y Druzhinina, I. S. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. Studies Mycol. 55: 135-177.

- Kavanagh, K. 2005. Fungal Fermentation Systems and Products. In K. Kavanagh (Ed). Fungi Biology and Applications (89-112). England. John Wiley & Sons Ltd.
- Kirk, T. K., Burgess, R. R. y Koning, J. W. 1992. Use of fungi in pulping wood: an overview of biopulping research. En: Leatham, G. F. (Eds). Frontiers in industrial mycology. Proceedings of Industrial Mycology symposium. Routledge, Chapman & Hall. New York.
- Kolvenbach, B., Schlaich, N., Raoui, Z., Prell, J., Zühlke, S., Schaffer, A., Guengerich, F. P. y Corvini, P. F. X. 2007. Degradation Pathway of Bisphenol A: Does ipso Substitution Apply to Phenols Containing a Quaternary α -Carbon Structure in the para Position?. Applied And Environmental Microbiology. 73 (15): 4776–4784.
- Kovacs, K., Szakacs, G. y Zacchi, G. 2009. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. Bioresource Technol. 100: 1350–1357.
- Lehninger, A. L. (1995). Bioquímica. Barcelona, España: Ediciones Omega, S. A.
- Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., y Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. Juornal Basic Microbiology., 3-4:185-227.
- Lewis, N. G. y Yamamoto, E. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. Annu. Rev. Plant Phys. 41:455-496.
- Lladó, S. 2014. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbioanas implicadas. Tesis de Doctorado en Microbiología Ambiental y Biotecnología.
- Lynd, L., Weimer, P., Zyl, W. y Pretorius, I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Rev.Microb. Molec. Biol. 66:506–577.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker J. 1998. editores. Brock. Biología de los microorganismos. España: Prentice Hall.

- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruíz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guilen, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. y del Río, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8: 1995-204.
- Martínez, B. Infante, D. y Peteira, B. 2015. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Rev. Protección Veg.* 30 11-22.
- Martins, L. O; Soares, C. M; Pereira, M. M; Teixeira, M; Costa, T; Jones, G. H. y Henriques, A. O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277:18849-18859.
- McGuirl, M. A. y Dooley, D. M. 1999. Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:138-144.
- Michel, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euascomycetes:Hyppocreales), su antibiosos y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis Doctoral en Biotecnología, México: Universidad de Colima.
- Murray, K.E.; Thomas, S.M. y Bodour, A. A. 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. En: *Environmental Pollution*. Vol. 158. p. 3462–3471.
- Palmer, A. E., Lee, S. K., y Solomon, E. I. 2001. Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the O-O bond. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:6591-6599.
- Palmieri, G., Giardina, P., Fontanella, B., Bianco, C., Sannia, G. (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the lignonolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 66:920-924.
- Paolacin, J. M. 2015. Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma Harzianum* Y *Trichoderma Hamatum* en sustrato sólido. Universidad Central Del Ecuador, 1-107.
- Papagianni, M., Nokes, S. y Filer, K. 2001. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity

- on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Tech. Biot.* 39:319–326.
- Pérez-Montiel, G. 2017. Biodegradación de bisfenol a por *Pleurotus ostreatus* crecido en fermentación sumergida y su efecto sobre la actividad enzimática de lacasas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Quindós, A. G. 2015. Investigación y ciencia -SCIENTIFIC AMERICAN. Obtenido de Micosis: Los hongos invisibles y las enfermedades que provocan: <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/74/posts/micosis-los-hongos-invisibles-y-las-enfermedades-que-provocan-13225>.
- Ramírez-Mendoza, B. 2018. Efecto del Bisfenol-A sobre el crecimiento y actividad enzimática de *Aspergillus fumigatus* aislado de suelos contaminados. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L. y Steiman, R. 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere.* 40: 557-563.
- RIKZ. 2001 Chemical study on bisphenol A. RIKZ/2001.027. Technical report. Rijks institu voor Kust en Zee, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, The Netherlands.
- Rodríguez-Couto, S. y Sanromán, M. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J Food Eng.*76:291–302.
- Rossmann, A. 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia.* 88(1): 1-19.
- Samuels, G. J. 2005. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology.* 96:195-206.
- Sangai, N., Pandya, H., y Singh, R. 2016. Critical Review on Bisphenol A: Invisible Pollution. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences,* 4(2), 1043-49.
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T., y Martínez, M. J. 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.,* 68:1534-1540.

- Schneider, P., Caspersen, M. B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L. K., Ostergaard, P. R., Brown, K. M., Brown, S. H. y Xu, F. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 25:502-508.
- Schuster, A. y Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.*87: 787–799. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1 PMID:20461510.
- Shin-ya O., Junji, M., Masahiro G., Shintaro, F., Hiroyuki, W. y Hiroo, T. 2002. Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. *Enzyme and Microbial Technology.* 31: 227–232.
- Solomon, E. I. y Lowery, M. D. 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science.* 259:1575-1581.
- Solomon, E. I., Chen, P., Metz, M., Lee, S. K., y Palmer, A. E. 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.,* 40:4570-4590.
- Srebotnik, E. y Hammel, K. E. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* 81:179-188.
- Stuart, M.; Lapworth, D., Crane, E. y Hart, A. 2012. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment.* . Vol. 416. p. 1-21
- Suárez, C. y Nieto. IJ. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología.* 30(1):1–8.
- Subba, M. Srinivasulu, P. Venkata, G. y Venkata, H. 2014. Effect of plastic pollution on environment. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences.* 0974-2115.
- Subramanian, C. V. 1983. *Hyphomycetes; taxonomy and biology* 1ª Ed. Academic Press, Nueva York, 502.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology,* 140:19-26.

- Tiwaria, D., Kamblea, J., Chilgundea, S., Patil, P., Marub, G., Kawleb, D. y Vanage, G. 2012. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutation Research*, 83– 90.
- Valdes, S. 2018. Aislamiento y purificación parcial de enzimas microbianas de tipo lacasa, para la degradación de desechos de piña; banano y caña. Maestría En Agricultura Alternativa con mención En Agricultura Ecológica. Universidad Nacional de Colombia.
- Valeriano, V. S., Silva, A. M. F., Santiago, M. F., Bara, M. T. F., y Garcia, T. A. 2009. “Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5-xylidine and ethanol,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, no. 4, pp. 790–794.
- Van Peij, N.N., Visser, J. and de Graaff, L.H. 1998. Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator coordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*. 27, 131-142.
- Vandenberg, L. N., Colborn. T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., Vom-Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T. y Myers, D. R. 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*.33:378.
- Vijayalakshmi, V., Senthilkumar, P., Mophin-Kani, K., Sivamani, S., Sivarajasekar, N. y Vasantharaj, S. 2017. Bio-degradation of Bisphenol A by *Pseudomonas aeruginosa* PAb1 isolated from effluent of thermal paper industry: Kinetic modeling and process optimization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 1-10.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godinez, G., Augur, C., 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 13, 157–167.
- Viterbo, A; Yagen, B; Rosenthal, R. y Mayer, A. M. 1993. Dependence of activity of cucurbitacin in repression of *Botrytis* laccase on its structure. *Phytochemistry*. 33:1313-1315.

- Walker, G. M. y White, N. A. 2017. In: Kavangh, K. (Ed.), Fungi: Biology and Applications. John Wiley & Sons.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., y Agathos, S. N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22:161-187.
- Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenthols by fungal laccase: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 35:7608-7614.
- Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H. J. W., Abbate, E., Galinyte, V. y Schneider, P. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2052-2056.
- Zafra, G., Moreno-Montaña, A., Absalón, A. E. y Cortés-Espinosa, D. V. 2014. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ Sci Pollut Res.* DOI: 10.1007/s11356-014-3357-y.