

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

ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE *Agrocybe*
pediades EN PRESENCIA DE HEXACLOROBENCENO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA

IQ AIME HERNÁNDEZ SIRIO

BAJO LA DIRECCIÓN DE

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DR. JAIME MARCIAL QUINO

Y TUTORÍA DE

DRA. LIBERTAD JUÁREZ SANTACRUZ

DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

Índice

Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	v
Abstract.....	vi
1. Introducción.....	1
1.1 Contaminantes químicos.....	3
1.1.1 Contaminantes orgánicos persistentes.....	4
1.1.2 Hexaclorobenceno (HCB).....	11
1.2 Hongos	14
1.2.1 Requerimientos físicos y químicos para el crecimiento de los hongos	16
1.2.2 Filo Basidiomycota	18
1.2.3 Hongos saprótrofos basidiomicetos	21
1.2.4 Mecanismos de tolerancia a compuestos tóxicos por los hongos	22
1.2.5 <i>Agrocybe pediades</i>	25
2. Antecedentes	27
2.1 Hexaclorobenceno en el estado de Tlaxcala	27
2.2 Degradación de HCB.....	27
2.3 Hongos con potencialidad para degradar compuestos tóxicos	28
2.4 <i>Agrocybe pediades</i>	29
3. Justificación.....	31
4. Objetivos.....	32
4.1 General	32
4.2 Específicos	32
5. Hipótesis.....	33
6. Metodología	34
6.1 Organismo.....	34
6.2 Propagación.....	34
6.3 Determinación de la tolerancia de <i>A. pediades</i> a HCB.....	34
6.4 Descripción de la capacidad de <i>A. pediades</i> para crecer en presencia de HCB mediante cometabolismo.....	37
6.5 Análisis estadísticos.....	39
7. Resultados	41
7.1 Evaluación de tolerancia de <i>A. pediades</i> a HCB	41

7.1.1 En cultivos en medio sólido	41
7.1.2 En cultivos en medio líquido.....	44
7.2 Capacidad de <i>A. pediades</i> para crecer en presencia de HCB mediante cometabolismo	46
7.2.1 Perfil de pH.....	46
7.2.2 Generación de biomasa.....	47
7.2.3 Glucosa residual	48
8. Discusión	51
8.1 Evaluación de tolerancia de <i>A. pediades</i> a HCB	51
8.2 <i>A. pediades</i> y cometabolismo con HCB	53
9. Conclusión.....	58
10. Recomendaciones.....	58
11. Literatura citada	59

Índice de tablas

Tabla 1. Contaminantes orgánicos persistentes incluidos en los anexos A, B y C del Convenio de Estocolmo (Stockholm Convention Secretariat, 2019).....	8
Tabla 2. Polisacáridos presentes en la pared celular según el grupo taxonómico en hongos. Modificado de Walker y White (2011).....	15
Tabla 3. Composición del medio mineral utilizado (Téllez-Téllez et al., 2008).....	35
Tabla 4. Tratamientos experimentales.....	36
Tabla 5. Diseño experimental segunda etapa.	37
Tabla 6. Medio mineral utilizado en la segunda etapa (Rojas, 2010).....	38
Tabla 7. Velocidad media de crecimiento de <i>A. pediades</i> en diferentes tratamientos \pm DE. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey.....	44
Tabla 8. Velocidad específica de crecimiento de <i>A. pediades</i> . Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$)...	48

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los primeros compuestos incluidos en el Convenio de Estocolmo (Modificado de Ashraf, 2017)	7
Figura 2. A) Esporas (— 15 µm), y B) basidios (flecha roja) característicos de un basidiomiceto (Ortega, 2018).	16
Figura 3. Fotografía de basidiomicetos A) <i>Agrocybe pediades</i> , B) <i>Gymnopus</i> sp. (Ortega, 2018)	18
Figura 4. Ciclo de vida general de un basidiomiceto. (Modificado de Deacon, 2006)	20
Figura 5. Imagen del cuerpo fructífero de <i>Agrocybe pediades</i> (Ortega, 2018).....	26
Figura 6 Cuerpo fructífero de <i>A. pediades</i>	29
Figura 7. Diagrama general de la metodología	40
Figura 8. Morfología del crecimiento de <i>A. pediades</i> en diferentes tratamientos al día 14.	41
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>A. pediades</i> en cada tratamiento en medio de cultivo mineral compuesto (Téllez-Téllez et al., 2008). Cada punto representa la media de cinco réplicas ± desviación estándar (DE).....	42
Figura 10. Gráfica del crecimiento micelial de <i>A. pediades</i> en el día 20 en medio de cultivo mineral compuesto (Téllez-Téllez et al., 2008). Cada barra representa la media de cinco réplicas ± DE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).....	43
Figura 11. Generación de biomasa de <i>A. pediades</i> en medio líquido al día 13 de crecimiento en cada tratamiento. Cada barra representa la media de tres réplicas ± DE. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$)	45
Figura 12. Perfil de pH de los cultivos de <i>A. pediades</i> . cada punto representa la media de tres réplicas ± DE.....	46
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>A. pediades</i> en medio líquido. Cada punto representa la media de tres réplicas ± DE.....	47
Figura 14. Glucosa residual en el medio de cultivo del tratamiento control, del tratamiento con cloroformo y del tratamiento que contiene HCB con glucosa. Cada punto representa la media de tres réplicas ± DE.....	49
Figura 15. Generación de biomasa (♦) y glucosa residual (○) en el tratamiento con 300 µg/l de HCB. Cada punto representa la media de tres réplicas ± DE.....	50

Resumen

Los contaminantes orgánicos persistentes (COP) se caracterizan porque son resistentes a la degradación, tienen una alta movilidad en el ambiente, se bioacumulan y biomagnifican; esto hace que causen daños a la biota tanto cercana como lejana a su origen de emisión. Uno de los primeros contaminantes orgánicos persistentes en ser reconocido como tal es el hexaclorobenceno, el cual se utilizó como fungicida para semillas y presenta efectos nocivos para la salud humana, razón por la que se suspendió su uso en diversos países en la década de los años 70. A pesar de sus efectos, aún se produce como compuesto secundario durante la fabricación de disolventes clorados, y dado su carácter persistente todavía se encuentra en el ambiente, así como en el tejido adiposo de humanos que no han estado expuestos laboralmente a dicho compuesto. Como parte de la diversidad de organismos que alberga el planeta, destacan microorganismos como los hongos, capaces de desarrollarse en ambientes donde están presentes este tipo de compuestos. Ante tal situación es interesante y necesario conocer las habilidades que poseen para afrontar tales circunstancias y así poder sentar las bases para el desarrollo de biotecnologías que permitan eliminar contaminantes orgánicos persistentes del ambiente.

En el presente estudio se analizó la capacidad de crecimiento de *Agrocybe pediades*, en presencia de HCB; este hongo es un basidiomiceto aislado de un bosque perturbado por incendios frecuentes y pastoreo, en el estado de Tlaxcala, en presencia de HCB. Para las pruebas de tolerancia se utilizaron concentraciones de 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/l de HCB. El hongo mostró un crecimiento similar en casi todas las concentraciones usadas con respecto al control, con excepción de la concentración de 300 µg/l, donde el crecimiento fue mayor ($p < 0.05$). Los resultados muestran que al ser el HCB un factor de estrés para *A. pediades* su presencia puede ocasionar que el hongo modifique su metabolismo o fisiología de tal forma que aproveche los nutrientes residuales del cilindro de agar que se utilizó como inóculo, ya que después de 12 días de crecimiento la biomasa generada fue de 3.14 ± 0.28 g/l en el tratamiento que fue adicionado con 300 µg/l HCB; mientras que en el tratamiento control, la biomasa generada fue de

2.87 ± 0.06 g/l, es decir se obtuvo aproximadamente un 9.44 % más de biomasa, además de que el consumo de glucosa en estos dos tratamientos fue similar, sin descartar la posibilidad de que una parte del crecimiento se deba a que el hongo es capaz de utilizar el HCB como fuente de carbono

Con los resultados obtenidos se puede concluir que *Agrocybe pediades* implementa algún mecanismo que le permite tolerar y crecer en presencia de HCB en concentraciones de hasta 500 µg/l, tanto en medio sólido como en medio líquido, sin descartar la posibilidad que también lo haga con otros COP.

A partir de estos resultados se podrán realizar diversas investigaciones que permitan conocer el mecanismo que despliega este hongo para tolerar compuestos tóxicos, así como en el desarrollo de tecnologías enfocadas en la recuperación de ambientes contaminados con diversos COP.

Abstract

1. Introducción

El ambiente está expuesto a deterioro y contaminación natural por la acción de eventos como incendios, o fenómenos naturales como erupciones volcánicas o huracanes; sin embargo, la interminable búsqueda del hombre por satisfacer sus necesidades y tener una vida más confortable ha acelerado el deterioro del ambiente al producirse de manera continua, acelerada y extensiva diversos bienes y servicios que contribuyen al deterioro ambiental.

La manufactura de diversos productos industriales y su uso final lleva consigo la generación de diferentes residuos, entre los que se encuentran los contaminantes orgánicos persistentes (COP) que poseen propiedades tóxicas y causan impactos negativos en los ecosistemas (Albert, 1997), lo que ha generado la preocupación de diferentes organizaciones a nivel internacional. Como respuesta, los países interesados en mitigar el problema, en el año 2001 firmaron el Convenio de Estocolmo, que busca proteger el ambiente y la vida humana de los efectos que causan los COP. El hexaclorobenceno (HCB) es uno de los compuestos incluidos en el Convenio, el cual fue utilizado como fungicida en semillas de trigo, cebada, avena y centeno; pero por los efectos que causa, como carcinogenicidad, alteraciones hepáticas, dérmicas, renales, pulmonares y gastrointestinales (Gavilán y Castro, 2007) se suspendió su uso en varios países en la década de los años 70 (ATSDR, 2019).

Desafortunadamente, el HCB se sigue produciendo de forma secundaria durante la fabricación de solventes clorados; y por sus propiedades y alta resistencia a la degradación aún se encuentra en el ambiente, además, al ser lipofílico es capaz de moverse a través de la cadena trófica llegando incluso a humanos que no han estado directamente expuestos a él. Debido a esto, constantemente se buscan alternativas para eliminarlo de ambientes contaminados (Estévez y Kopytko, 2015; Ceci *et al.*, 2018; Ibáñez-Moreno *et al.*, 2020). Los microorganismos son de especial interés para estos fines, ya que pueden ser resistentes o tolerantes a este tipo de tóxicos, gracias a que poseen mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes contaminados con COP. Entre los microorganismos que se han usado

en pruebas de tolerancia o biodegradación de HCB se encuentran algunas especies de hongos saprótrofos (Matheus *et al.*, 2000) y los mecanismos de tolerancia que se han descrito son la biosorción, la bioacumulación, la biotransformación y la biodegradación (Vullo, 2003).

Algunas especies de la familia Strophariaceae como *Psilocybe castanella* han mostrado capacidad para tolerar y disminuir la concentración de HCB en muestras de suelo mediante el mecanismo de biodegradación (Matheus *et al.*, 2000), en el cual se han tratado de relacionar las actividades enzimáticas del complejo propio de hongos con hábitos saprótrofos (Kab-Yeul *et al.*, 2009). Debido a que la producción de enzimas es una de las características bioquímicas que pueden ser utilizadas para establecer relaciones filogenéticas (Cepero de García *et al.*, 2012), en este caso, los hongos pertenecientes a esta misma familia podrían mostrar mayor probabilidad de tolerar y/o degradar HCB.

Agrocybe pediades, un hongo saprótrofo aislado de un bosque de *Juniperus deppeana* que ha sufrido de actividad antrópica como incendios recurrentes (Ortega, 2018), y a que en la región se han descrito zonas cercanas con presencia de este compuesto, que al ser volátil podría encontrarse en el bosque de donde fue aislado (Juárez-Santacruz *et al.*, 2013), podría presentar la capacidad de tolerar al HCB; sumado a esto, pertenece a la familia Strophariaceae, de la cual algunas especies han mostrado la capacidad de tolerar estos COP. Por estas razones, el presente estudio pretende generar información respecto al potencial de *A. pediades* para tolerar la presencia de HCB.

El contexto en el que se enmarca el presente estudio implica profundizar un poco más en diversos temas referentes a la dinámica ambiental en la que se conjugan interacciones entre los hongos y los tóxicos, lo que nos brinda la oportunidad, a través de su estudio, de visualizar los beneficios que sus mecanismos intrínsecos representan para el campo de la bioprospección sobre todo con miras a la aplicación en la recuperación de ambientes alterados por contaminantes químicos.

1.1 Contaminantes químicos

Un contaminante se puede definir como aquella sustancia que se encuentra en el ambiente cuya presencia deteriora la calidad de éste al producir efectos no deseados o afectar negativamente la utilidad de algún recurso (Colina, 2000). Los contaminantes se clasifican en tres tipos: físicos, que involucran a la energía en sus diversas formas como la energía mecánica (ruido y vibraciones), la energía electromagnética (luz visible, ultravioleta, infrarroja, etc.) y la energía calorífica (calor o su ausencia, frío); biológicos, que incluyen tanto a los microorganismos como a sus productos biológicos; y contaminantes químicos, que comprenden compuestos orgánicos, inorgánicos, naturales o sintéticos que pueden producir a corto, mediano o largo plazo efectos dañinos a los organismos, dependiendo de la cantidad absorbida (de Navarra, 2000).

Dentro de los contaminantes químicos existe una gran variedad de compuestos, por lo tanto, este tipo de contaminantes representa un riesgo importante para el ambiente. Gran parte de estos compuestos son residuos que provienen de los jales mineros abandonados con poco o ningún proceso de remediación, lo que ocasiona la migración de metales pesados a los ambientes cercanos contribuyendo con la contaminación del suelo, además de que son tóxicos para las plantas y ejercen efectos negativos sobre la calidad de los recursos naturales y el ambiente (Martínez *et al.*, 2017). También, pueden provenir de desechos de la industria, por ejemplo, las dioxinas y los retardantes de flama se vinculan con procesos de producción y reciclaje de productos electrónicos, y los colorantes mutagénicos con la industria textil. Además, de la disposición inadecuada de residuos, cuyos lixiviados contaminan suelos y acuíferos (Mendoza-Cantu e Ize-Lema, 2017). La industria textil impacta al ambiente debido a las aguas residuales con alta carga de contaminantes que se generan en los procesos, sobre todo por la presencia de colorantes con toxicidad sobre la biota acuática (Sánchez *et al.*, 2018). Aunado a esto, diversos residuos provienen de desechos de la agricultura ya sea por el uso de fertilizantes o plaguicidas que al ser aplicados en campos de cultivo alteran los ciclos biogeoquímicos, además de que pueden producir efectos tóxicos agudos y

crónicos sobre algunos organismos (Andrade, 2016). Algunos son vertidos directamente, otros se forman por la reacción entre diferentes compuestos al estar en contacto en el ambiente (SEPA, 2007).

Muchos de los contaminantes químicos son compuestos orgánicos xenobióticos, es decir, que no se producen de forma natural en la Tierra, por lo tanto, son extraños al metabolismo natural de los organismos vivos (Tejedor, 2008) y al estar presentes causan efectos adversos a los seres que la habitan, como la modificación de la estructura y función de las capacidades funcionales de los tejidos o las células (Sanz, 2013). Su riesgo reside en su persistencia en el ambiente, es decir la capacidad para retener sus características físicas, químicas y funcionales durante un periodo prolongado (ATSDR, 2002) debido a su alta estabilidad termodinámica, a su resistencia a la biodegradación y consecuente acumulación, por lo que este tipo de compuestos pueden producir diversos efectos tóxicos en la salud humana, como los carcinogénicos, los mutagénicos y los teratogénicos (Peña-García, 2016).

Por la forma en que inciden en las matrices y componentes ambientales, se pueden clasificar como: contaminantes orgánicos volátiles (COV) (Arroyo *et al.*, 2018) y contaminantes orgánicos persistentes (COP) (Bartolomé, 2015).

1.1.1 Contaminantes orgánicos persistentes

Los COP son compuestos resistentes a la degradación fotoquímica, química o bioquímica, esta característica permite que aumente su vida media en el ambiente. Este tipo de compuestos pueden ser de origen natural, como las dioxinas, que pueden producirse en procesos como las erupciones que liberan la presión que se genera dentro o por debajo de la corteza terrestre (OMS, 2016), algunos otros productos son generados por reacciones que ocurren espontáneamente como el benzo(a)pireno (Reategui, 2017). Sin embargo, la mayoría son compuestos generados por el hombre mediante reacciones químicas formadas en diversos procesos industriales (Ritter *et al.* 1995; Wang *et al.* 2010).

Dependiendo de su composición química se han clasificado en dos subgrupos: hidrocarburos aromáticos policíclicos, que son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos condensados, los cuales pueden estar en forma recta, angulados o racimados (Mastandrea *et al.*, 2005). Hidrocarburos halogenados, que son compuestos que contienen uno o más átomos de un halógeno unido a uno o más átomos de carbono (García, 2018), y predomina como componente halógeno el cloro. Debido a la estabilidad del enlace carbono-halógeno este tipo de compuestos son poco reactivos y conforme aumenta el número de sustituyentes del halógeno disminuye su reactividad e incrementa su persistencia; los compuestos aromáticos clorados son más estables y resistentes a la degradación que los alifáticos clorados, además la mayoría de los COP clorados son aromáticos (Albert, 1997).

La persistencia y volatilidad parcial que tienen los COP son las propiedades que caracterizan su movilidad ambiental. Es decir, pueden volatilizarse y ser transportados a otro lugar sin sufrir cambios en su estructura química. La volatilidad depende de la temperatura, por lo que estos compuestos pueden participar en ciclos consecutivos de volatilización y deposición, lo que les permite transportarse con los vientos y pasar de un ecosistema a otro ubicado a grandes distancias (Gouin *et al.*, 2004). Los COP, son más solubles en solventes orgánicos que en soluciones acuosas, lo que les confiere la propiedad de pasar fácilmente a través de la estructura fosfolipídica de las membranas biológicas, aumentando su biodisponibilidad. El conjunto de sus características provoca que los COP entren a las cadenas alimenticias y se bioacumulen en cada nivel trófico en los tejidos grasos de los organismos y, además, se bio-magnifiquen, este proceso sucede cuando un contaminante que es incorporado y almacenado por un organismo que se encuentra en la base de la cadena alimenticia pasa en grandes cantidades al organismo del siguiente nivel de la cadena, así la sustancia contaminante se magnifica de un nivel a otro hasta alcanzar concentraciones letales para algún organismo de la cadena o hasta que llegan a los niveles superiores de ésta (Miren, 2006). La velocidad de bioacumulación depende de diversos factores, como la naturaleza química de cada compuesto que involucra la solubilidad en

agua, la presión de vapor, la constante de la ley de Henry (H), el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) y el coeficiente de partición carbón/agua (K_{oc}), propiedades que están dadas por la estructura de la molécula y por la naturaleza de los átomos que la forman; también depende de la cantidad del contaminante que entra al organismo, la velocidad de absorción y la velocidad de excreción (Albert, 1997; Herrero, 2012).

Cuando los contaminantes orgánicos persistentes se incorporan al ambiente, se distribuyen con facilidad y pueden encontrarse como gases, adsorberse a las partículas de polvos, sedimentos o suelos y a la superficie de las plantas, así como en aguas de todo tipo, aunque en concentraciones menores (SEPA, 2007), por lo que pueden afectar a diversos organismos. Algunas de las alteraciones más severas en los humanos son el bajo desempeño neuronal, afectaciones en el sistema inmunológico e incluso puede provocar cáncer, ya que ocasionan efectos disruptores sobre el sistema endocrino (Andrade-Ribeiro *et al.*, 2006); mientras que en el ambiente contribuyen a la disminución de la diversidad biológica (Bartolomé, 2015).

Debido a las características de los COP y al peligro que representan, en mayo de 2001 se celebró una conferencia en Estocolmo, Suecia donde se adoptó el Convenio de Estocolmo, el cual tiene como objetivo proteger la salud humana y el medio ambiente frente a estos contaminantes. En el documento se establecen las medidas que deben adoptarse para disminuir o eliminar las liberaciones derivadas del uso, de la producción intencionada o no de estas sustancias, así como la eliminación de desechos y los planes de aplicación que debe elaborar e implementar cada parte, entre otros aspectos, para cumplir el objetivo del convenio (Stockholm Convention Secretariat, 2019).

Este Convenio entró en vigor con un grupo de 12 sustancias (figura 1), con las cuales se trabajó hasta el año 2008, cuando fueron incluidas nuevas sustancias a los anexos.

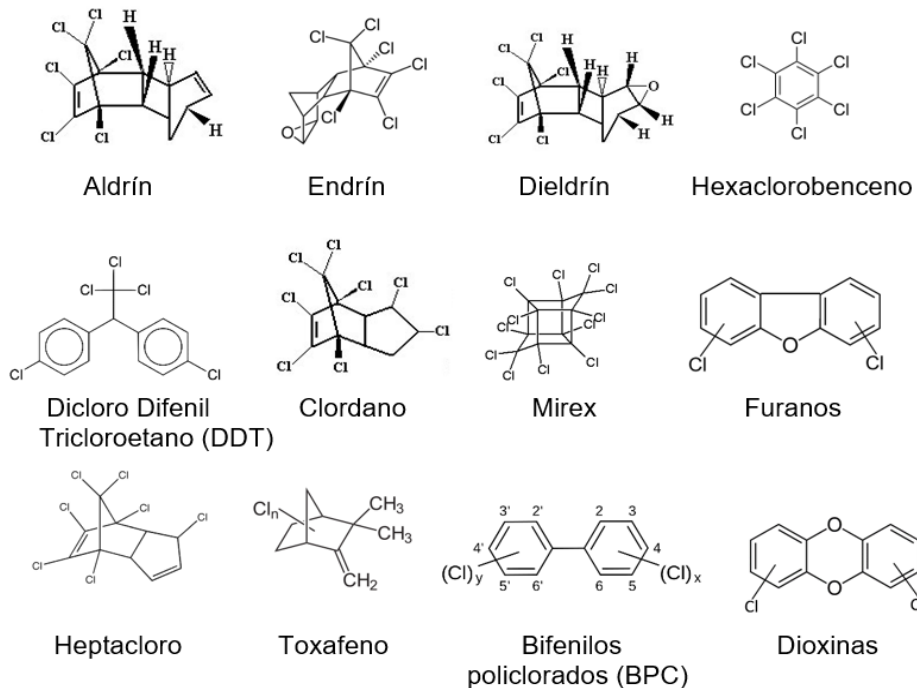


Figura 1. Estructura química de los primeros compuestos incluidos en el Convenio de Estocolmo (Modificado de Ashraf, 2017)

Actualmente, en el Convenio se enlistan 29 COP (Tabla 1), agrupados ya sea para su eliminación, restricción o producción no intencional. Para las sustancias incluidas en el anexo A, las partes deben tomar las medidas necesarias para eliminar la producción y el uso; para las sustancias del anexo B, las partes deben restringir su uso y producción; por último, para las sustancias del anexo C, las partes tomarán medidas para reducir su liberación no intencional con la meta de reducirla al mínimo y si es posible eliminarlas (Stockholm Convention Secretariat, 2019).

Tabla 1. Contaminantes orgánicos persistentes incluidos en los anexos A, B y C del Convenio de Estocolmo (Stockholm Convention Secretariat, 2019)

Anexo	Producto químico	Fuentes de COP
A. Eliminar la producción	Ácido perfluorooctanoíco (PFOA), sus sales y compuestos relacionados	Productos químicos industriales Producción no intencional
	Aldrín	Pesticida
	Alfa hexaclorociclohexano	Pesticida
	Beta hexaclorociclohexano	Pesticida
	Bifenilos policlorados	Productos químicos industriales Producción no intencional
	Clordano	Pesticida
	Clordecona	Pesticida
	Decabromodifenil éter (mezcla comercial, c-DecaBDE)	Productos químicos industriales
	Dicofol	Pesticida
	Dieldrín	Pesticida
	Endosulfan técnico y sus isómeros relacionados	Pesticida
	Endrín	Pesticida
	Heptacloro	Pesticida
	Hexabromobifenilo	Productos químicos industriales
	Hexabromociclodecano	Productos químicos industriales
Hexabromodifenil éter y heptabromodifenil éter	Productos químicos industriales	

Tabla 1. Contaminantes orgánicos persistentes incluidos en los anexos A, B y C del Convenio de Estocolmo (Stockholm Convention Secretariat, 2019) (continuación)

Anexo	Producto químico	Fuentes de COP
A. Eliminar la producción	Hexaclorobenceno	Pesticida Productos químicos industriales Producción no intencional
	Hexaclorobutadieno	Productos químicos industriales Producción no intencional
	Lindano	Pesticida
	Mirex	Pesticida
	Naftalenos policlorados	Productos químicos industriales Producción no intencional
	Parafinas cloradas de cadena corta (SCCPc)	Productos químicos industriales
	Pentaclorobenceno	Pesticida Productos químicos industriales Producción no intencional
	Pentaclorofenol y sus sales y ésteres	Pesticida
	Tetrabromodifenil éter y pentabromodifenil éter	Productos químicos industriales
	Toxafeno	Pesticida

Tabla 1. Contaminantes orgánicos persistentes incluidos en los anexos A, B y C del Convenio de Estocolmo (Stockholm Convention Secretariat, 2019) (continuación)

Anexo	Producto químico	Fuentes de COP
B. Restringir la producción	Ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS) sus sales y fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF)	Productos químicos industriales
	DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorodifenil) etano)	Pesticida
C. Producción no intencional	Bifenilos policlorados	Productos químicos industriales
	Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados	Productos químicos industriales
	Hexaclorobenceno	Pesticida Productos químicos industriales Producción no intencional
	Naftalenos policlorados	Productos químicos industriales Producción no intencional
	Pentaclorobenceno	Pesticida Productos químicos industriales Producción no intencional

Dos de los compuestos que se encuentran en los anexos del Convenio, pentaclorobenceno y hexaclorobenceno, tienen como fuente de emisión a los pesticidas, al formar parte de su composición, productos químicos industriales y procesos en los que se producen de manera no intencional. Por esta razón, aunque el hexaclorobenceno es uno de los doce primeros compuestos incluidos en el convenio aún se encuentra en el ambiente.

1.1.2 Hexaclorobenceno (HCB)

Es un compuesto orgánico clorado con fórmula química C_6Cl_6 , su número de registro en el servicio de resúmenes químicos (CAS por sus siglas en inglés) de la Sociedad Americana de la Química es 118-74-1. También suele ser nombrado como perclorobenceno, cloruro de pentaclorofenilo o percloro de fenilo. A temperatura ambiente es un sólido blanco cristalino prácticamente insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos como éter, benceno y cloroformo.

El valor del log del coeficiente de partición octanol/agua del hexaclorobenceno es de 5.73, que indica una muy alta afinidad por el material lipídico de la biota, lo cual aumenta la probabilidad de bioacumularse y por lo tanto de favorecer su toxicidad. Otra de sus propiedades es que debido a su baja presión de vapor de 1.09×10^{-5} mmHg a $20\text{ }^\circ\text{C}$ se adsorbe a las partículas de aire facilitando su transporte en la atmósfera; su constante de la Ley de Henry es de 5.8×10^{-4} atm \cdot m³/mol lo que le confiere una moderada volatilidad (García, 2016; ATSDR, 2019).

El HCB se ha utilizado en la industria en la fabricación de productos pirotécnicos, balas trazadoras y como fundente en la fabricación de aluminio, así como conservador de la madera, controlador de porosidad en la fabricación de ánodos de grafito y como agente peptizante en la producción de caucho nitroso y estireno para neumáticos (Wang *et al.* 2010).

El principal uso del HCB fue en la agricultura en el tratamiento de semillas de trigo, cebada, avena y centeno para evitar el crecimiento de hongos parásitos. Uno de los incidentes más graves ocasionados por el HCB ocurrió en Turquía entre los años 1955 y 1959, donde los granos de trigo que fueron tratados con este compuesto fueron utilizados para elaborar pan, el cual fue consumido por la población, lo cual generó más de 600 casos de porfiria cutánea tardía, una enfermedad hepática que presenta como efecto principal la reducción o la inhibición de la formación del grupo hemo. Esta enfermedad puede producir orina de color rojo, llagas en la piel, cambio de color de la piel, artritis y problemas del hígado, del sistema nervioso y del estómago, entre otras afectaciones. Se estimó que hasta 5000 personas se vieron afectadas, de las cuales aproximadamente el

80 % fueron niños de 4 a 14 años. Durante varios meses la dosis estimada fue de 50-200 mg/día. La concentración promedio en la leche de 56 madres con porfiria cutánea, 20-30 años después del incidente, fue de 510 ng/g en base a grasa, lo que causó que al menos el 95 % de niños, hijos de madres que tenían porfiria cutánea tardía, murieron dentro del primer año de nacimiento, y muchos no sobrevivieron entre las edades de 2-5 años (Seku, 2015; ATSDR, 2019).

Aunque su producción se ha suspendido en la mayoría de los países, todavía se está produciendo inadvertidamente como un subproducto y/o impureza en varios procesos químicos, sobre todo en la fabricación de solventes como el tetracloruro de carbono, tricloroetileno y tetracloroetileno. Además, algunos pesticidas como clorotalonil, pentacloronitrobenceno, picloram, simazina, atrazina y lindano tienen HCB como contaminante. También se produce a partir de la descomposición térmica incompleta de desechos donde el cloro está presente. Estos procesos de combustión incluyen todo tipo de incineración de residuos (residuos peligrosos, residuos municipales, residuos médicos y lodos de depuradora), producción de cemento, sinterización de mineral de hierro, combustión de carbón y quema de biomasa. Aunque algunos desechos que contienen HCB se eliminan en vertederos, una fracción de él que se encuentra en los lixiviados es emitida a la atmósfera por su lenta volatilización y por el desplazamiento del suelo contaminado (Lu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018).

Debido a sus características estructurales, es decir al anillo aromático y a los enlaces C-Cl presentes, el HCB tiene una alta estabilidad lo que le confiere una gran resistencia a la degradación que, en conjunto con la moderada volatilidad que posee favorece su transporte a largas distancias, incluso a regiones alejadas de su fuente de liberación. El transporte se presenta mediante la destilación global, también conocida como efecto saltamontes (Gouin *et al.*, 2004), en la cual ciertas sustancias liberadas a la atmósfera en zonas cálidas viajan a zonas más frías depositándose allí y causando afectaciones a los organismos que habitan esos ambientes. Por todo ello, es importante considerar la reducción de este compuesto

en el ambiente como un intento para la preservación de las especies, así como del ambiente (Newhook y Dormer, 1997).

Existen procesos de oxidación avanzada que han sido estudiados con el fin de degradar COP, las técnicas que se utilizan en estos procesos son electrólisis, ozonización, reacciones fenton, oxidación húmeda, oxidación con agua supercrítica, ionización, radiación, microondas, pulsos de plasma y fotocátalisis homogénea y heterogénea.

Una de las principales técnicas estudiadas para la mineralización de contaminantes orgánicos y la reducción de metales pesados es la fotocátalisis heterogénea que combina simultáneamente reacciones de oxidación y reducción. Esta técnica involucra el uso de luz y de un catalizador para que las reacciones químicas se produzcan o se aceleren. Uno de los catalizadores más estudiados es el TiO_2 en forma de nanocintas, mostrando cierta efectividad en la mineralización de algunos contaminantes orgánicos, sin embargo, estos resultados se restringen únicamente a COP presentes en matrices acuosas. La efectividad de estos procedimientos se ve afectada por diversos factores como las características de las aguas a tratar, sistema seleccionado, condiciones de operación, pH, la presencia de aniones inorgánicos que pueden consumir los agentes oxidantes implicados en la degradación de contaminantes orgánicos, y la unión de nanopartículas mediante fuerzas electrostáticas generando partículas de mayor tamaño, disminuyendo así la eficiencia (Vargas-Hernández *et al.*, 2016; Ibáñez-Moreno *et al.*, 2020).

Debido a que existen diversos factores que pueden afectar la eficiencia de técnicas de tratamiento químicas, se han buscado otras alternativas que puedan contribuir con esta labor. Si bien se ha descrito que la presencia de compuestos organoclorados causa varios problemas a la salud de una diversidad de organismos, incluyendo al humano (Howsan *et al.*, 2004), es innegable la existencia de microorganismos que resisten o toleran sus efectos nocivos e incluso poseen la capacidad de transformarlos en compuestos aprovechables como sustratos para su supervivencia. De modo recurrente se ha descrito que bacterias

pertenecientes al género *Dehalococcoides* son capaces de degradar HCB debido a que este tipo de bacterias obtienen energía a través de la oxidación de hidrógeno y la posterior deshalogenación reductora de compuestos orgánicos halogenados en un modo de respiración anaeróbica obligatoria (Adrian *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha precisado que algunas especies de hongos son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Kab-Yeul *et al.*, 2009). Esta capacidad es por la acción de los complejos enzimáticos que poseen, como las enzimas poli y fenoloxidasas, además de algunas peroxidasas (Pozdnyakova *et al.*, 2018). Existen especies fúngicas capaces de crecer en ambientes que han sido depositarios de compuestos tóxicos residuales provenientes de diferentes actividades antrópicas o como resultado de fenómenos naturales (Manzano *et al.*, 2014), lo que sugiere que cuentan con los mecanismos para hacer frente a estas condiciones, debido a esto el recurso fúngico puede ser una alternativa en el campo de la recuperación de ambientes mediante el estudio de proteínas y sus funciones.

1.2 Hongos

Son organismos eucarióticos, es decir, que tienen su material genético delimitado por una membrana; el núcleo, contiene varios cromosomas y poseen una gama de orgánulos citoplasmáticos contenidos por la membrana celular. Las formas de crecimiento más común son levaduras unicelulares y hongos filamentosos. Estos últimos tienen como estructura somática básica, a la hifa, una estructura tubular que se ramifica conforme el hongo crece. Las hifas pueden estar divididas en compartimentos por septos, que son paredes transversales formadas por el crecimiento centrípeto de la pared celular, los septos no son rígidos y poseen aberturas o poros que permiten el flujo de citoplasma entre células adyacentes (Bourett, James y Howard, 2007). Las repetidas ramificaciones de las hifas dan lugar al micelio, el cual crece dentro del sustrato como una red y podría extenderse infinitamente a través del crecimiento apical siempre que se encuentren los suficientes nutrientes apropiados, así como las condiciones ambientales necesarias para favorecer el desarrollo. Las diferentes regiones interconectadas

del micelio fúngico pueden crecer, ramificarse, anastomosarse (fusionarse), envejecer, morir, esporular y mostrar diferentes actividades fisiológicas y bioquímicas en distintos momentos o incluso simultáneamente, dependiendo de las condiciones microambientales locales. Los hongos filamentosos y las levaduras son diferentes formas de crecimiento que se adecuan para ocupar diferentes hábitats. Muchas especies denominadas hongos dimórficos pueden adoptar formas micelial o levaduriforme de acuerdo con las circunstancias ambientales (Walker y White, 2011; Cepero de García *et al.* 2012).

Los hongos al igual que las plantas y las bacterias poseen pared celular, la cual es responsable de la forma del hongo y constituye la interfase entre el hongo y su medio, es una estructura permeable que realiza diversas funciones de vital importancia. Su principal función es la de proteger contra factores ambientales como el estrés, los daños por acción de la luz ultravioleta y de productos químicos, también ayuda a mantener condiciones osmóticas estables dentro de la célula. En la pared también se almacenan algunas enzimas líticas que participan en el rompimiento de moléculas para proporcionar nutrientes al hongo. La pared celular está compuesta por polisacáridos como la quitina y el glucano, que otorgan rigidez a la estructura del hongo; así como proteínas y otros compuestos en distintas proporciones. Generalmente se relaciona la presencia de dos polisacáridos principales en la pared celular, con el grupo taxonómico al cual pertenece el organismo (Tabla 2) (Deacon, 2006; Dhavale y Jedd, 2007; Godoy, 2019).

Tabla 2. Polisacáridos presentes en la pared celular según el grupo taxonómico en hongos. Modificado de Walker y White (2011).

Grupo taxonómico	Polímeros presentes en la pared
Oomycetes	β (1,3)-, β (1,6)-Glucano celulosa
Chytridiomycetes	Quitina; glucano
Glomeromycetes	Quitina; quitosano
Zygomycetes	Quitina; quitosano
Basidiomycetes	Quitina; β (1,3)-, β (1,6)-glucanos
Ascomycetes/Deuteromycetes	Quitina; β (1,3)-, β (1,6)-glucanos

En los hongos se presentan dos tipos de reproducción: asexual y sexual, en esta última generalmente producen esporas. El tipo de esporas se relaciona con el filo al que pertenece un hongo. Las esporas de los hongos del filo Ascomycota son las ascosporas; para los hongos del filo Basidiomycota son las basidiosporas (Figura 2); para los hongos del filo Zygomycota son las zigosporas; en Glomeromycota son las glomerosporas -producidas exclusivamente de manera asexual- y para los hongos del filo Oomycota son las oosporas; las esporas varían en forma, tamaño y otras propiedades relacionadas con su papel en la dispersión o supervivencia (Deacon, 2006; Cepero de García *et al.*, 2012).

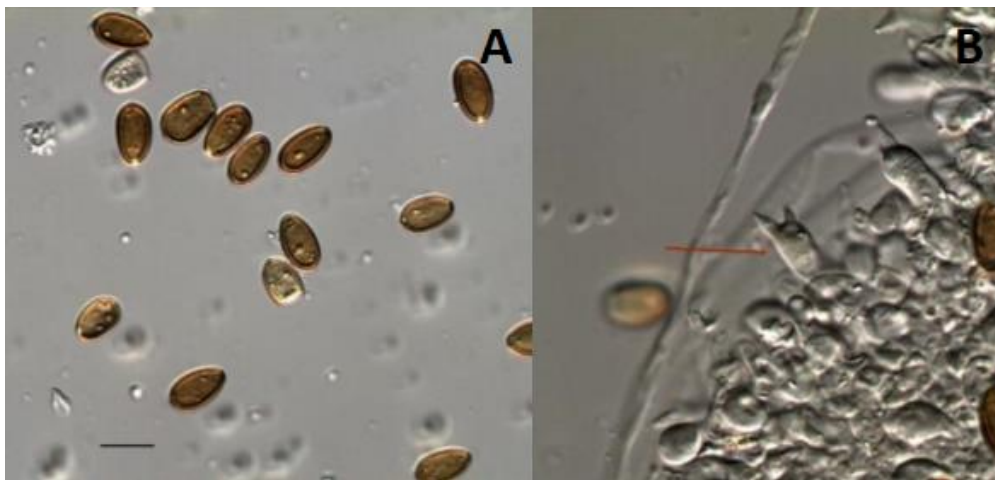


Figura 2. A) Esporas (— 15 μ m), y B) basidios (flecha roja) característicos de un basidiomiceto (Ortega, 2018).

1.2.1 Requerimientos físicos y químicos para el crecimiento de los hongos

La mayoría de los hongos crecen en condiciones cálidas, ácidas y aeróbicas. El intervalo de temperatura para su crecimiento es bastante amplio, pero la mayoría de las especies crecen muy bien alrededor de los 25 °C. Sin embargo, en la naturaleza existen hongos psicrófilos, que crecen en intervalos de 5 hasta 20 °C, y hongos termófilos, que crecen a temperaturas mayores a 45 °C. Se requiere de una alta cantidad de agua disponible para el crecimiento de la mayoría de los hongos, ya que es esencial para el metabolismo fúngico; cualquier condición externa que reduzca la disponibilidad de agua afectará negativamente la fisiología

celular. En cuanto al pH, la mayoría de los hongos son acidófilos, crecen bien entre pH 4 y 6 pero muchas especies pueden crecer, aunque en menor medida, en condiciones más ácidas o alcalinas (alrededor de pH 3 o pH 8, respectivamente). Otros parámetros físicos que influyen en la fisiología fúngica incluyen radiación, aireación, presión, fuerza centrífuga y tensión mecánica de corte (Álvarez, 2011; Walker y White, 2011).

Las necesidades nutricionales de los hongos son relativamente simples y la mayoría de las especies podrían sobrevivir bastante bien en condiciones aeróbicas si se le suministra glucosa, sales de amonio, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento. Los macronutrientes comprenden fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio; y los micronutrientes que comprenden oligoelementos como calcio, cobre, hierro, manganeso y zinc, serían necesarios para el crecimiento de las células fúngicas. Al ser quimiorganotróficos, los hongos necesitan formas fijas de compuestos orgánicos para su suministro de carbono y energía. Los azúcares se utilizan ampliamente para el crecimiento de los hongos y pueden variar desde hexosas simples, como glucosa, hasta polisacáridos, como almidón y celulosa. Algunos hongos pueden utilizar polímeros como la lignina (Deacon, 2006; Walker y White, 2011; Cepero de García *et al.*, 2012).

La adquisición de nutrientes en hongos es un proceso regulado que involucra la digestión extracelular, el transporte de los nutrientes absorbidos y su metabolismo. La particular forma de nutrición de los hongos consiste en absorber los nutrientes orgánicos solubles que requieren como fuente de energía a través de la pared y la membrana. Son organismos heterótrofos que se alimentan por absorción después de digerir extracelularmente los nutrientes por acción de enzimas secretadas al medio que los rodea. Sin embargo, se puede hacer una distinción de acuerdo con la forma en que obtienen estos nutrientes; puede ser creciendo como un agente patógeno de otro organismo vivo, creciendo como un simbiote en asociación con otro organismo, o como saprótrofo, creciendo en materiales no vivos o en materia orgánica muerta (Fricker *et al.*, 2007; Walker y White, 2011).

Los hongos juegan un papel ecológico fundamental al participar en el reciclaje del carbono y para el humano representan además una fuente de metabolitos de interés biotecnológico, metabolitos secundarios y enzimas que degradan polímeros complejos como almidón, celulosa, quitina, entre otras, incluso materiales lignificados como la madera. Los hongos producen muchas enzimas intra y extracelulares, además de contar con vías enzimáticas que pueden aprovecharse para la bioconversión de compuestos tóxicos con estructuras similares a las de sus sustratos naturales. La gama de enzimas que pueden producir depende del grupo o filo al cual pertenezcan, puede ser, Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota. Éste último filo es el segundo con más especies, muchas de éstas se caracterizan por la producción de basidiocarpos (Deacon, 2006).

1.2.2 Filo Basidiomycota

El filo basidiomycota representa aproximadamente el 35 % de las especies de hongos conocidas. Aunque los ejemplos más familiares de este grupo son los hongos y las setas, como los que se muestran en la figura 3, hay una gran diversidad de especies incluidas algunas levaduras, como *Rhodototrula glutinis*, patógenos vegetales importantes, como *Ustilago maydis*, y algunos patógenos humanos como *Cryptococcus neoformans* (Deacon, 2006; Fitzpatrick y Medina, 2011; Pimentel-González *et al.*, 2011; Mukaremera y Nielsen, 2017).



Figura 3. Fotografía de basidiomicetos A) *Agrocybe pediades*, B) *Gymnopus* sp. (Ortega, 2018)

Este filo tiene como principal característica la presencia de los basidios, estructuras especializadas que producen las esporas sexuales o basidiosporas, las cuales generalmente son monocarióticas y haploides. La cariogamia y la meiosis son procesos que se llevan a cabo en el basidio, por lo tanto, en cada basidio se produce típicamente un número definido de basidiosporas, que es cuatro. Debido a esto y a su complejidad morfológica los hongos basidiomicetos son consideradas especies avanzadas (Cepero de García *et al.*, 2012; Rojas, 2013).

El ciclo de vida general de un hongo típico se muestra en la Figura 4. Cada basidiospora contiene un solo núcleo haploide, germina y crece formando colonias hifales de micelio primario ya que tienen un núcleo simple en cada compartimiento de las hifas, esta fase en la que se encuentra el hongo es llamada monocariótica. El monocarión produce pequeñas oidias que pueden actuar como elementos fertilizantes o pueden germinar para producir futuras colonias monocarióticas (Alexopoulos y Mims, 1985; Deacon, 2006).

En la siguiente etapa del desarrollo se forma el micelio secundario, el cual ocurre cuando las hifas de dos monocarióntes o de diferentes grupos compatibles se fusionan entre sí, o cuando una oidia de un grupo compatible atrae a una hifa de un grupo compatible diferente para formar un micelio secundario y dicariótico cuyas células poseen núcleos haploides que se complementan genéticamente. Una vez que los dos grupos compatibles son fusionados por el proceso denominado plasmogamia, todo el crecimiento subsecuente ocurre por hifas dicarióticas en cada compartimiento hifal. (Deacon, 2006; Cepero de García *et al.*, 2012).

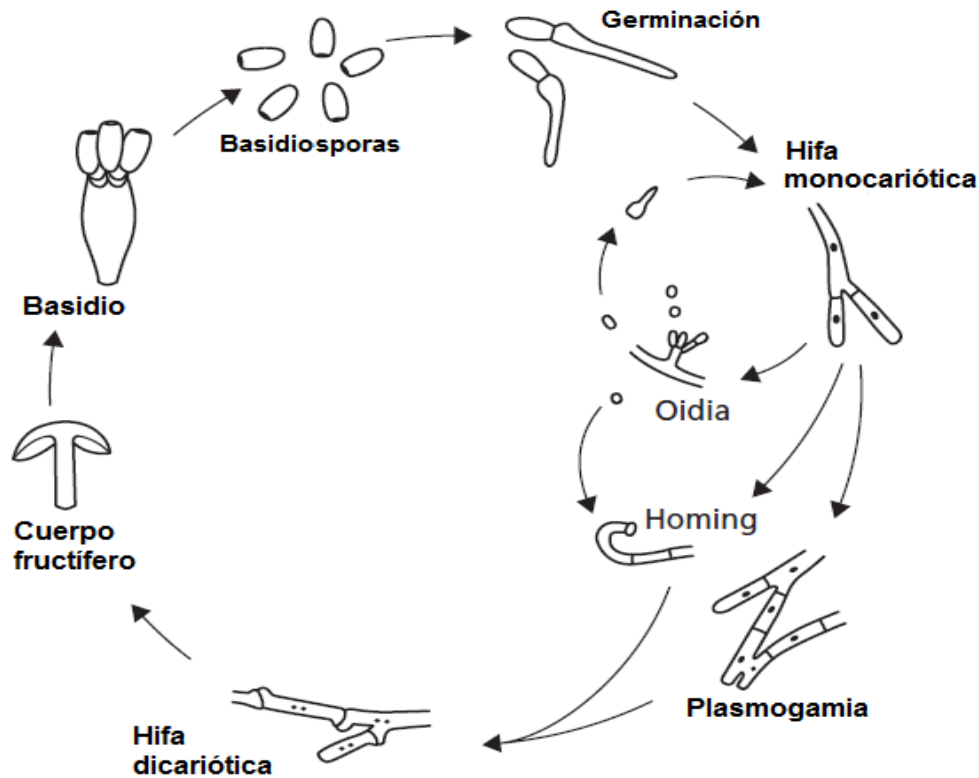


Figura 4. Ciclo de vida general de un basidiomiceto. (Modificado de Deacon, 2006)

El hongo puede crecer durante semanas, meses o incluso años en esta forma, produciendo una amplia red de hifas dicarióticas, pero en respuesta a las señales ambientales producirá un cuerpo fructífero, que es llamado micelio terciario ya que está representado por agregaciones hifales complejas, organizadas y especializadas que componen los cuerpos fructíferos, también llamados basidiocarpos (Alexopoulos y Mims, 1985; Deacon, 2006; Cepero de García *et al.*, 2012).

Aunque el micelio puede persistir bastante tiempo en estado vegetativo, la longevidad de los cuerpos fructíferos es variable, ya que depende de la depredación, de los parásitos y de las condiciones ambientales (Weber, 2009).

El hábitat de la mayoría de los Basidiomycota es terrestre y sus esporas son dispersadas por el viento principalmente, pero también existen hongos

basidiomicetos que crecen en agua dulce o en hábitats marinos en todas las latitudes (Cepero de García *et al.*, 2012).

Respecto a su forma de vida, algunos pueden realizar asociaciones simbióticas de varios tipos con otros organismos; y pueden ser mutualistas cuando el resultado de la asociación es benéfico para los organismos que intervienen en ella; cuando se establece un tipo de relación en la cual el único beneficiado es el hongo y no su hospedero, se denominan parásitos, pero también hay hongos que no realizan asociaciones con otros organismos, son saprótrofos.

1.2.3 Hongos saprótrofos basidiomicetos

Así como otros organismos, los hongos contribuyen a la dinámica de los ecosistemas debido a que desempeñan un papel esencial en su desarrollo, estabilidad y función.

Los hongos saprótrofos se encuentran en todos los entornos terrestres, ya que pueden utilizar restos de organismos muertos como sustrato para adquirir los nutrientes necesarios para vivir y excretar al suelo nutrientes inorgánicos que puedan ser tomados por las plantas. De esta forma, los hongos, al igual que otros microorganismos, son responsables del reciclaje de los componentes de las plantas muertas y de la descomposición de los restos de animales y de otros microorganismos. Además, son considerados como organismos recicladores por excelencia debido a que intervienen en los ciclos del carbono, del nitrógeno, del fósforo y del potasio (Cepero de García *et al.*, 2012; Crowther *et al.* 2012)

La alimentación de estos hongos se lleva a cabo mediante la disolución del material que colonizan, como la madera; si degradan lignina o celulosa, provocan diferentes tipos de pudrición: pudrición blanca cuando degradan celulosa, hemicelulosa y lignina; pudrición marrón cuando degradan celulosa, hemicelulosa y poca o nada de lignina; y pudrición blanda, cuando afectan la superficie de la madera que se encuentra en ambientes muy húmedos o en agua y degradando la celulosa y la hemicelulosa (Cuesta, 2003; Webster y Weber, 2007).

Para poder alimentarse de dichos materiales se requiere de la liberación de enzimas y la posterior absorción de la materia orgánica resultante. Debido a esta forma de alimentarse es que estos organismos producen una amplia cantidad de enzimas extracelulares como α -amilasa, amiloglucosidasa, glucosa aerohidrogenasa, proteasas, hemicelulasas, entre otras, con importantes características comerciales para la conversión de almidón, en la elaboración de jarabes de almidón, alimentos con dextrosa, producción de ácido glucónico y procesamiento de alimentos, por mencionar algunos (Cuesta, 2003; Bills y Gloer, 2018)

Existen algunos grupos de hongos saprótrofos clasificados por su comportamiento: Hongos pioneros saprótrofos, los cuales se caracterizan por que generalmente utilizan sustratos solubles simples, como azúcares y compuestos de carbono de tejidos vegetales más simples que la celulosa. Hongos degradadores de polímeros complejos, los cuales degradan polímeros como la celulosa. Y hongos degradadores de materiales recalcitrantes, los cuales se especializan en degradar materiales orgánicos muy complejos para tener acceso a ciertos polímeros (Deacon, 2006), incluyendo aquellos materiales que suelen ser clasificados como tóxicos, como los hidrocarburos de petróleo (Cárdenas, 2017). Esto es posible debido a que existen diversos mecanismos que permiten a los hongos tolerar los compuestos mencionados.

1.2.4 Mecanismos de tolerancia a compuestos tóxicos por los hongos

Los seres vivos, incluyendo a los hongos, tienen un alto grado de organización, lo que involucra la presencia de diversos mecanismos que se manifiestan debido a la diversidad de relaciones que tienen con el ambiente. El nivel en que influyen los factores medioambientales sobre los organismos está dado por la intensidad y la duración de un factor de estrés en interacción con las características y los mecanismos de los organismos. De acuerdo con Zlatev *et al.* (2003) para cada uno de los procesos fisiológicos que conforman un sistema vivo existe un límite de estabilidad a partir del cual algún factor ambiental, ya sea biótico o abiótico genera estrés en un organismo. Si las condiciones ambientales fueran totalmente

constantes, cuando se presente alguna variación, por minúscula que sea, afectaría en gran medida a los organismos que incluso no sobrevivirían (Strasburguer *et al.* 2002). Por lo tanto, el estrés es el conjunto de respuestas ya sea fisiológicas o bioquímicas que definen a un estado particular del organismo diferente al estado observado bajo una serie de condiciones que se encuentran dentro del límite de estabilidad (Kolowski y Pallardy, 1997).

En general los factores de estrés pueden ser clasificados en físicos, bióticos y químicos, siendo estos últimos unos de los que han recibido mayor atención por los daños que pueden causar a la biota. Dependiendo de las características que posea cada factor, éstos pueden determinar y/o limitar los mecanismos de respuesta de una determinada especie u organismo (Varela, 2010).

La particularidad que tiene un organismo caracterizado por una refractariedad al efecto de algún factor de estrés es conocida como resistencia (Sussmann *et al.* 2001), que consiste en los mecanismos permanentes determinados genéticamente, los cuales no están relacionados con el incremento del factor de estrés, ya sea en intensidad o duración. Por otro lado, cuando los organismos cuentan con una habilidad que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción de un factor de estrés por medio de mecanismos para sobrevivir a la exposición de tales factores estresantes que para otros organismos sería letal se trata de tolerancia (Vullo, 2003). Algunos de los mecanismos que se han descrito como parte de la tolerancia hacia algunos compuestos químicos, sobre todo por parte de microorganismos, son la biosorción, que consiste en la retención del tóxico mediante una interacción fisicoquímica de éste con ligandos de la superficie celular; la bioacumulación, la cual involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al tóxico presente en el entorno celular con gasto energético y una vez incorporado al citoplasma se puede unir a algunas proteínas o acumular en vacuolas en el caso de los hongos; la biotransformación, que involucra un cambio químico sobre el tóxico mediado por enzimas microbianas, sin embargo, el compuesto resultante puede ser poco soluble en agua o bien compuestos volátiles; la biodegradación, donde los

microorganismos utilizan contaminantes tóxicos y recalcitrantes como sustratos y los emplean principalmente para producir energía.

Se han estudiado algunas especies de hongos que pueden degradar compuestos orgánicos, ya sean polímeros naturales o algunos xenobióticos como los pesticidas a través de los productos de diversas rutas metabólicas (Henn *et al.*, 2020).

La degradación de este tipo de moléculas puede ocurrir mediante enzimas no específicas (cometabolismo) o mediante enzimas altamente específicas que tienen como fin aprovechar tales moléculas como fuente de nutrientes y/o energía que aportan al crecimiento de dichos organismos.

En el cometabolismo el papel natural de la enzima de degradación es el de metabolizar otra molécula (normalmente no contaminante), pero, dada la baja especificidad de esta enzima, puede degradar contaminantes con estructuras semejantes a su sustrato natural. Este proceso suele ser lento y la degradación es parcial. Al tratarse de una enzima no específica, este proceso puede ser inhibitorio, es decir que en el medio se encuentre otro compuesto con estructura similar y la acción de la enzima suceda sobre ese compuesto en lugar del contaminante, en otras palabras, la enzima podría estar utilizando el sustrato equivocado, además, es posible que el producto de la reacción sea tóxico para otros organismos e incluso para ese mismo organismo, que secreta las enzimas que actúan sobre el compuesto. Para estimular el cometabolismo, la fuente de carbono, además de no ser una fuente tóxica, debe inducir la expresión de los genes de degradación, es decir aquellos que codifican proteínas responsables de la degradación.

En otros casos el contaminante puede servir a los organismos como una fuente de uno o más elementos esenciales para su crecimiento. En estos casos la degradación está relacionada con el crecimiento de los organismos y las enzimas que participan son específicas, por lo que la tasa de degradación es más rápida (Arbelli, 2009).

Existe una variedad de hongos capaces de transformar compuestos tóxicos como algunos pesticidas; *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*, presentan

capacidad para degradar toxafeno en muestras de suelo con sustratos como aserrín y cascarilla de arroz (Luna-Fontalvo *et al.*, 2017). *Pleurotus ostreatus*, contribuyó con la disminución de lindano y de algunos contaminantes recalcitrantes de muestras de suelo (EarthFax, 2013), mientras que *Psilocybe cf. castanella*, fue capaz de disminuir la concentración de HCB en suelo (Matheus *et al.*, 2000).

A pesar de que se han encontrado diversas especies de hongos con capacidad de degradar compuestos tóxicos, aún existen otras que no han sido del todo estudiadas, dentro de las cuales pudieran encontrarse algunas prometedoras en el ámbito de la biodegradación debido a su capacidad de colonizar ambientes en donde los tóxicos pueden estar eventualmente presentes.

1.2.5 *Agrocybe pediades*

Agrocybe pediades, es una especie de hongo que pertenece a la familia Strophariaceae del orden Agaricales, división o filo *Basidiomycota*.

Los basidiomas de *Agrocybe pediades* se componen de un píleo de 1 a 3 cm de diámetro en su fase adulta, con coloración café oscuro, láminas adheridas, anchas, color crema. El estípite es de 3.5 - 5.5 de largo x 0.2 -0.3 cm de diámetro, cilíndrico, color blanco cremoso y de consistencia fibrosa. Esporas de 9-13 x 6.6-7.5 μm , lisas, elípticas, truncadas, de color café oscuro, con poro germinativo apical. Esta especie contribuye a la desintegración de la materia orgánica, es decir, es un hongo saprótrofo (Herrera *et al.*, 2006).

Agrocybe pediades se ha aislado de un bosque de *Juniperus deppeana* en el estado de Tlaxcala (figura 5). La diferencia más importante se encuentra en que las esporas miden 8.2-10.2 μm X 14.3-16.8 μm , siendo de mayor tamaño del que se han reportado (Ortega, 2018).



Figura 5. Imagen del cuerpo fructífero de *Agrocybe pediades* (Ortega, 2018).

Esta especie ha sido aislada de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, zona donde se han identificado hidrocarburos aromáticos policíclicos que están relacionados con las emisiones vehiculares y con la quema de basura al aire libre (Amador-Muñoz, *et al*, 2001); también se ha aislado de un bosque que ha sufrido diversas afectaciones como incendios, en donde sí la combustión no fue completa es posible que se formen algunos COP, debido a esto es importante estudiar a este organismos como una posible especie tolerante a estos compuestos.

2. Antecedentes

2.1 Hexaclorobenceno en el estado de Tlaxcala

Desafortunadamente diversos contaminantes orgánicos persistentes se pueden encontrar en casi cualquier ambiente, incluso donde éstos no fueron utilizados, esto se ve reflejado en el estudio realizado en el año 2013 por Juárez-Santacruz *et al.* en el estado de Tlaxcala, donde a partir del análisis de muestras de sedimentos superficiales de los ríos Zahuapan y Atoyac lograron identificar la presencia de diversos COP, como algunos isómeros de hexaclorociclohexano (HCH), DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorodifenil) etano) y DDE (1,1dicloro-2,2-bis(p-clorofenil) etileno), mirex, aldrín, 41 congéneres de bifenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés), así como de HCB. Las concentraciones de este último oscilaron entre 45 y 450 µg/kg de sedimento en peso seco, relacionando estas concentraciones con fuentes puntuales de contaminación antrópica, así como con el transporte atmosférico que pueden tener estos compuestos a gran escala, lo que constituye un riesgo potencial para la salud humana y al ambiente (Juárez-Santacruz *et al.*, 2013).

2.2 Degradación de HCB

Debido al interés en diseñar estrategias biológicas para la disminución, la degradación o la eliminación del contaminantes orgánicos persistentes en diferentes matrices ambientales, existen varios estudios respecto a la capacidad de algunos basidiomicetos para estos fines. En una investigación realizada por Matheus *et al.* en el año 2000, determinaron la tolerancia de 36 cepas a diferentes concentraciones de compuestos organoclorados, en donde inocularon muestras de suelo contaminado con 25 y 50 g de HCB kg⁻¹ de suelo, teniendo como testigo suelo inoculado no contaminado. Las cepas que fueron consideradas tolerantes a estos compuestos colonizaron más del 25 % del suelo. Bajo condiciones de asepsia, 2.5 g de inóculo de cada hongo seleccionado fue inoculado en 25 g de una mezcla de suelo contaminado. Después de 65 días determinaron la concentración de cloruros (Cl⁻) en extractos, mediante cromatografía de gases de alta resolución. Dos de las cepas seleccionadas *Trametes villosa*, una especie

lignícola que fue aislada de un bosque lejano de las áreas contaminadas y *Psilocybe cf. castanella*, aislado de suelo arenoso contaminado cercano a un vertedero industrial, fueron capaces de tolerar concentraciones mayores a 25 g HCB kg⁻¹ en suelo. Se mostró la capacidad de degradación de dos especies de hongo saprótrofas, aunque sin profundizar en las particularidades de los mecanismos que intervienen.

2.3 Hongos con potencialidad para degradar compuestos tóxicos

Debido a la alta toxicidad y persistencia de los COP se han buscado alternativas para reducir su presencia en el ambiente. Existen organismos como algunos hongos que son capaces de crecer en presencia de compuestos xenobióticos, como los COP. Un ejemplo de estos organismos es el basidiomiceto *Stropharia rugosannulata*, el cual en un estudio realizado por Pozdnyakova *et al.* en el año 2018 mostró capacidad para degradar una amplia gama de contaminantes ambientales como hidrocarburos aromáticos policíclicos y colorantes sintéticos de atraquinona que contienen anillos aromáticos condensados. Dicho fenómeno es acompañado de la producción de polisacáridos extracelulares y de un compuesto emulsionante. También se demostró la producción de enzimas ligninolíticas como lacasa y Mn peroxidasa, de las que, aunque ésta última es la primera en producirse, la enzima lacasa tiene una mayor actividad enzimática, por lo que se considera ampliamente la participación de éstas en la degradación de los contaminantes. De acuerdo con la producción de polisacáridos extracelulares, la oxidación de compuestos aromáticos naturales y contaminantes ambientales catalizada por lacasas mejora en presencia de éstos.

También, se ha trabajado en la búsqueda y selección de funciones biodegradantes de materiales lignocelulósicos en hongos de podredumbre blanca, en el intento de determinar aquellos elementos que realizan dichas funciones. En un trabajo realizado por Kab-Yeul *et al.* en el año 2009 analizaron 83 cepas de hongos en las cuales se comprobó la producción de enzimas ligninolíticas agregando indicadores al medio de cultivo en sólido como goma de la planta de guayaco en etanol y solución acuosa de siringaldazina al 0.1 %. Además, determinaron la capacidad de

degradación del colorante poly R-478 por las cepas en medio líquido. Evaluaron la decoloración mediante los cambios de la absorbancia del fluido extracelular y determinaron las actividades lacasa, Mn peroxidasa y lignina peroxidasa. Clasificaron las cepas de acuerdo con su habilidad para decolorar, y la cepa de *Agrocybe pediades* generó buenos resultados en la decoloración y en el crecimiento micelial en cultivos con agitación, sin embargo, no relacionan a ninguna de las enzimas evaluadas como elemento causante de la degradación. La importancia de utilizar poly R-478 radica en que los colorantes de antraquinona son considerados compuestos muy estables, por lo que son considerados como contaminantes altamente persistentes que son difíciles de degradar, debido a esto, son modelos ampliamente utilizados en estudios de biodegradación.

Ante este panorama, es posible visualizar las características que en principio podrían poseer algunas especies de hongos con potencial para tolerar la presencia de COP, de interés para estudios *in vitro*, enfocados hacia la degradación.

2.4 *Agrocybe pediades*

Agrocybe pediades es un hongo que fue aislado de un bosque de *Juniperus* del estado de Tlaxcala (Figura 6), Ortega (2018) evaluó las condiciones que favorecen su cultivo *in vitro*. Las condiciones adecuadas para preservar la cepa son a 4 °C y en una solución de glicerol al 15 %. Dado que es un hongo con hábitos saprófitos y a que fue aislado de un sitio perturbado existe la posibilidad de que tenga la capacidad de crecer o incluso transformar compuestos tóxicos.

Por otro lado, Torres (2017) identificó de forma cualitativa la presencia de enzimas con actividad lacasa, manganeso peroxidasa y celulasa en medio sólido producidas por *A. pediades* y *Gymnopus sp.* mediante la adición de sustratos afines a estas enzimas. Además, utilizó la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*, productor conocido de dichas enzimas, como referente. En dichos experimentos *A. pediades* mostró el mayor índice de potencia. En una segunda



Figura 6 Cuerpo fructífero de *A. pediades* (Ortega, 2018)

etapa realizó un análisis cuantitativo de las actividades enzimáticas en medio de cultivo líquido, en el caso de *A. pediades* la mayor actividad lacasa fue de 6.25 UI/mL y de manganeso peroxidasa de 67.95 UI/mL, mientras que en *Gymnopus* sp., la mayor actividad lacasa fue de 3.06 UI/mL y no se observó actividad manganeso peroxidasa. En el caso de *P. ostreatus*, mostró actividad lacasa de 21.20 UI/mL y de manganeso peroxidasa de 147.23 UI/mL. Se observó una diferencia significativa de las actividades con respecto a *A. pedides* y *Gymnopus* sp., además *A. pediades* expresó dos isoenzimas de lacasa de mayor tamaño, aproximadamente de 72 y 95 kDa, a las expresadas por *P. ostreatus*, aproximadamente de 36 y 55 kDa, esta diferencia podría ser una forma de brindar protección a la enzima de las condiciones de perturbación del ambiente del que fue aislado el hongo para que ésta realice su función.

3. Justificación

En el ambiente se puede encontrar una gran variedad de compuestos xenobióticos, muchos de ellos de alta toxicidad, tal como el HCB, que, al ser un contaminante orgánico persistente, subproducto de algunos procesos industriales y formarse mediante la combustión incompleta de residuos organoclorados, está presente de manera constante y tiene el potencial de causar daño a la salud humana.

A pesar de la perturbación que sufre el ambiente, la existencia de organismos, como los hongos, capaces de crecer en presencia de diversos contaminantes, incluyendo al HCB y que han mostrado la capacidad de eliminarlos, representa una oportunidad para atender a esta problemática. Sin embargo, aún hace falta estudios enfocados en especies capaces de recuperar ambientes mediante la biorremediación. Dada la diversidad de ecosistemas que hay en el país y el constante deterioro que sufren algunas regiones, es posible encontrar una amplia variedad de recursos vivos adaptados a tolerar la presencia de COP. Este es el caso de *Agrocybe pediades*, que habita un bosque de *Juniperus* perturbado ubicado en el estado de Tlaxcala y con evidencia de que produce el complejo enzimático que se ha sugerido como participante del proceso de la degradación de HCB. La presente investigación permitirá aportar conocimiento respecto a la capacidad del hongo para tolerar HCB y conocer de manera parcial cual es el mecanismo que le brinda esta capacidad, lo que nos permitirá proporcionar un valor agregado a este recurso fúngico, así como acercarnos a encontrar una posible propuesta para la generación de tecnologías enfocadas en la recuperación de ambientes alterados con COP.

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar la tolerancia de *Agrocybe pediades* para crecer en presencia de hexaclorobenceno (HCB), cuando se usa como única fuente de carbono o en conjunto con glucosa, para dilucidar el mecanismo presente, ya sea cometabolismo o indicios que permitan sugerir su degradación

4.2 Específicos

Determinar el sistema de cultivo (sólido o líquido) y las concentraciones de HCB a las que puede crecer *A. pediades* a una temperatura constante de 27 °C y un pH inicial de 6.5 en medio sólido y en medio líquido para establecer las condiciones del experimento de tolerancia.

Describir si *A. pediades* tiene la capacidad para crecer en medio líquido con HCB para reconocer el mecanismo de cometabolismo o el uso como única fuente de carbono.

5. Hipótesis

Agrocybe pediades es un hongo saprótrofo con un complejo enzimático extracelular característico de la familia Strophariaceae, a la pertenece *Psilocybe castanella*, quien es capaz de degradar HCB. Por esta razón, es posible que *A. pediades* tenga también la capacidad de tolerar y crecer en presencia de hexaclorobenceno, preferentemente por cometabolismo.

6. Metodología

6.1 Organismo

Agrocybe pediades es un hongo saprótrofo aislado de un bosque de *Juniperus deppeana*, ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros en el estado de Tlaxcala, el cual está sujeto a una constante actividad de perturbación antrópica por pastoreo, cultivo e incendios. La cepa CIGYA 002 que corresponde a este hongo, forma parte de la colección de cepas fúngicas del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y cuenta con un duplicado con número de registro CM-CNRG 700 de la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP.

6.2 Propagación

Se realizó en cultivos sólidos empleando medio extracto de malta agar (EMA). Se utilizaron cilindros de agar de 11 mm de diámetro, colonizados con micelio, de los cuales se colocó uno en cada caja de Petri con medio de cultivo EMA. Las cajas fueron incubadas a 27 °C durante 16 días en total oscuridad. Una vez que el micelio invadió la superficie total de las cajas, se consideró que estaba en crecimiento activo y se seleccionó aquella caja que presentaba un crecimiento uniforme. Se obtuvieron cilindros de agar en las mismas condiciones a partir de los cuales se propagaron cinco cajas más con el fin de obtener suficiente biomasa, de la misma etapa de desarrollo, lo cual sirvió como inóculo para los experimentos planteados en este estudio. El resto de los cilindros de agar obtenidos fueron almacenados en una solución de glicerol al 15 % y a 4 °C para asegurar su conservación (Ortega, 2018).

6.3 Determinación de la tolerancia de *A. pediades* a HCB

Los criterios utilizados para evaluar la tolerancia fueron dos parámetros de crecimiento del hongo; la velocidad de crecimiento radial y la generación de biomasa, para lo cual se realizaron cultivos en medio sólido y en medio líquido. En todos los tratamientos se utilizó el medio mineral compuesto (MM) propuesto por

Téllez-Téllez *et al.* (2008) que tiene como fuente de carbono glucosa y como fuente de nitrógeno extracto de levadura, cuya composición se muestra en la tabla 3. Después de preparar el medio de cultivo se esterilizó a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos.

Tabla 3. Composición del medio mineral utilizado (Téllez-Téllez *et al.*, 2008)

Compuesto	Cantidad (g/l)
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.6
KH_2PO_4	0.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
K_2HPO_4	0.4
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001

Se trabajó con ocho concentraciones de HCB: 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/l que representan el intervalo de concentraciones probables descritas para regiones de Tlaxcala. Para preparar cada tratamiento se utilizó cloroformo (CHCl_3) como disolvente, por lo que un tratamiento fue adicionado con cloroformo para verificar si el disolvente residual, después del proceso de esterilización, tenía algún efecto sobre el hongo, además del tratamiento control sin HCB. En total se trabajó con diez tratamientos, cada uno con cinco réplicas para los cultivos en medio sólido y con tres réplicas para los cultivos en medio líquido. Los tratamientos del diseño experimental se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos experimentales.

Tratamiento	Condiciones	Medio / Réplicas	
		Sólido	Líquido
T1	MM + inóculo	5 réplicas	3 réplicas
T2	MM + inóculo + CHCl ₃	5 réplicas	3 réplicas
T3	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 10 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T4	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 20 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T5	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 50 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T6	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 100 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T7	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 200 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T8	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 300 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T9	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 400 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
T10	MM+ inóculo + CHCl ₃ + 500 µg/l de HCB	5 réplicas	3 réplicas
Unidades experimentales totales		50	30

*MM: Medio mineral.

Para los cultivos en medio sólido, se inocularon placas de 80 mm de diámetro con un cilindro de agar de 6 mm de diámetro colonizados con micelio, se incubaron a 27 °C y en oscuridad. Con el uso de un vernier digital marca Surtek se midió el diámetro micelial en periodos de 24 horas hasta que el micelio cubrió la superficie total de cada caja de Petri. Los cultivos en medio líquido se inocularon con tres cilindros de agar de 6 mm de diámetro colonizados con micelio, se incubaron en las mismas condiciones que los cultivos en medio sólido y con agitación orbital a 120 rpm. De los tratamientos en medio líquido se recuperó el micelio producido durante los días 3, 5, 7, 9, 11 y 13 mediante filtración al vacío para separarlo del medio de cultivo. El papel filtro se llevó a peso constante antes de ser utilizado. El micelio filtrado se llevó a peso constante en un horno de secado marca Luzeren a 45 °C durante 48 h, posteriormente se calculó el contenido de biomasa mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa} = (\text{Peso del filtro con la muestra} - \text{Peso inicial del filtro}) \times 20$$

Debido a que cada matraz contenía 50 ml de medio de cultivo, se multiplicó por 20 para obtener el valor de la biomasa en gramos por litro.

6.4 Descripción de la capacidad de *A. pediades* para crecer en presencia de HCB mediante cometabolismo

En esta etapa del proyecto se trabajó con cinco tratamientos cultivados en medio líquido. Para conocer la cinética de crecimiento de *A. pediades* se tomaron en cuenta las unidades experimentales en los días 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de crecimiento, cada muestreo con tres réplicas, es decir 24 unidades experimentales por tratamiento. El diseño experimental de esta etapa se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental segunda etapa.

Tratamiento	Condiciones	Muestréos	Réplicas por muestreo
T1	MM + inóculo	8	3
T2	MM + inóculo + CHCl ₃	8	3
T3	MM + inóculo + CHCl ₃ + 300 µg/l HCB	8	3
T4	(MM – sin glucosa) + inóculo + CHCl ₃ + 300 µg/l HCB	8	3
T5	MM + CHCl ₃ + 300 µg/l HCB	8	3
Unidades experimentales totales		120	

En esta etapa el tratamiento 1 correspondió al control del experimento; el T2 fue adicionado únicamente con CHCl₃ para evaluar el efecto del disolvente residual sobre el crecimiento del hongo; el tratamiento 3, adicionado con CHCl₃ y 300 µg/l de HCB permitió conocer si hay cometabolismo, a través de las diferencias de biomasa con respecto al control (T1); mientras que, con el tratamiento 4 se evaluó si *A. pediades* utilizó al HCB como fuente de carbono ya que en ese tratamiento el

medio de cultivo fue preparado sin glucosa. El tratamiento 5 que no fue inoculado fue un control abiótico que permite saber si disminuye la concentración de HCB por otros factores distintos a la presencia del hongo.

Los cultivos de esta etapa fueron preparados con el medio mineral que se presenta en la tabla 6. Se cambió el medio de cultivo debido a que el utilizado en la primera etapa cambia de color con el tiempo, lo cual afectaba en gran parte las mediciones del consumo de glucosa con el método del DNS, sin embargo, los dos medios de cultivo utilizados fueron probados (Torres, 2017) sin cambios en la tasa de crecimiento, el pH inicial del medio de cultivo fue de 5.5

Tabla 6. Medio mineral utilizado en la segunda etapa (Rojas, 2010)

Compuesto	Cantidad (g/l)
Glucosa	10
Extracto de levadura	1
KH_2PO_4	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
KCl	0.5

A partir del extracto de los cultivos se midió la concentración de glucosa residual mediante el método de DNS. El reactivo se preparó en frío; se pesaron 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Se disolvió el NaOH en 200 ml de agua destilada y en agitación se agregó lentamente el tartrato de Na-K. Se aforó con agua destilada hasta 400 ml y posteriormente se agregó lentamente el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se dejó en agitación toda la noche, se aforó a 500 ml y se filtró. El desarrollo de la reacción se realizó en tubos eppendorf de 2 ml, para realizar las mediciones se diluyó la muestra con medio mineral sin glucosa 1:5 v/v, posteriormente se agregaron 100 μl del reactivo de DNS. Los tubos se colocaron en un termobloque marca Labnet International, Inc. a 100 °C durante cinco minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se agregó 1 ml de agua destilada, se agitó y se realizó la lectura en un espectrofotómetro marca JENWAY a 540 nm (Bello *et al.* 2006).

La curva patrón de glucosa se realizó a partir de siete puntos con las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7 y 2 g/l. La solución stock y las diluciones necesarias se realizaron con medio de cultivo sin glucosa.

Además del consumo de glucosa, también se midió el pH de los extractos de los cultivos, con la finalidad de conocer como el hongo podía cambiar el pH del medio de cultivo cuando se encontraba en diferentes condiciones, como la ausencia de glucosa en el tratamiento 4 y la presencia de HCB en el tratamiento 3.

6.5 Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar que los datos pertenecen una distribución normal.

En la primera etapa, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para evaluar las diferencias significativas ($p < 0.05$) en la velocidad media de crecimiento en los cultivos en medio sólido, y en la generación de biomasa en los cultivos en medio líquido de los tratamientos con diferentes concentraciones de HCB. Para identificar entre que valores había diferencias se realizó una prueba post hoc de Tukey.

En la segunda etapa también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con la velocidad específica de crecimiento de los diferentes tratamientos, y mediante una prueba post hoc de Tukey se identificaron los valores entre los que había diferencia significativa ($p < 0.05$).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 25. La metodología descrita se resume en la Figura 7.

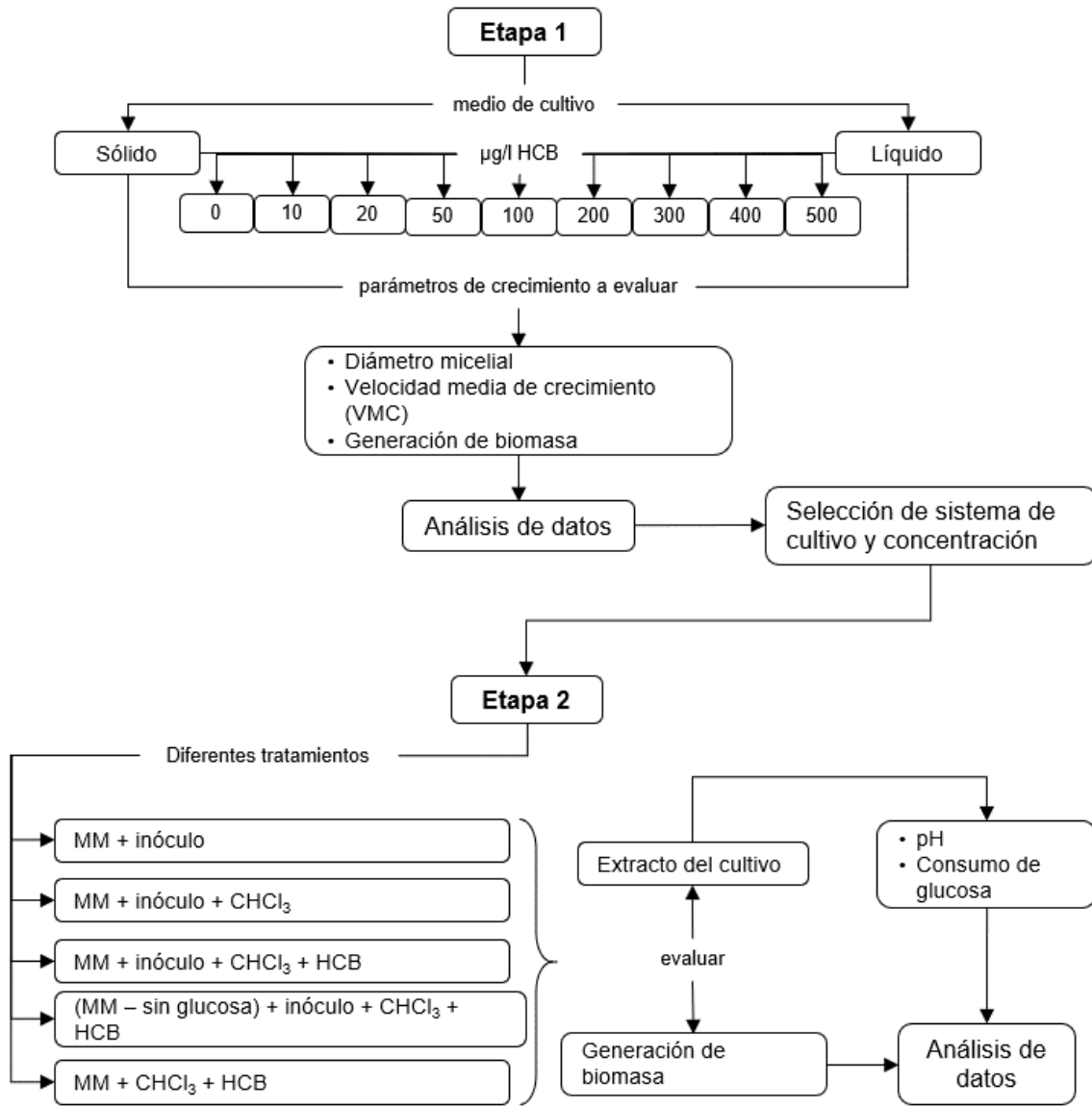


Figura 7. Diagrama general de la metodología

7. Resultados

7.1 Evaluación de tolerancia de *A. pediades* a HCB

7.1.1 En cultivos en medio sólido

En la figura 8 se muestra el desarrollo radial de una de las réplicas de cada tratamiento del hongo cultivado en placas con medio mineral compuesto de una de las réplicas de cada tratamiento después de 14 días de crecimiento, donde se aprecia cualitativamente que el micelio es ligeramente más denso en los tratamientos con concentraciones de 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g/l}$ de HCB con respecto al micelio del tratamiento control. Cuantitativamente, se registraron los valores de la velocidad de crecimiento radial para el análisis estadístico.

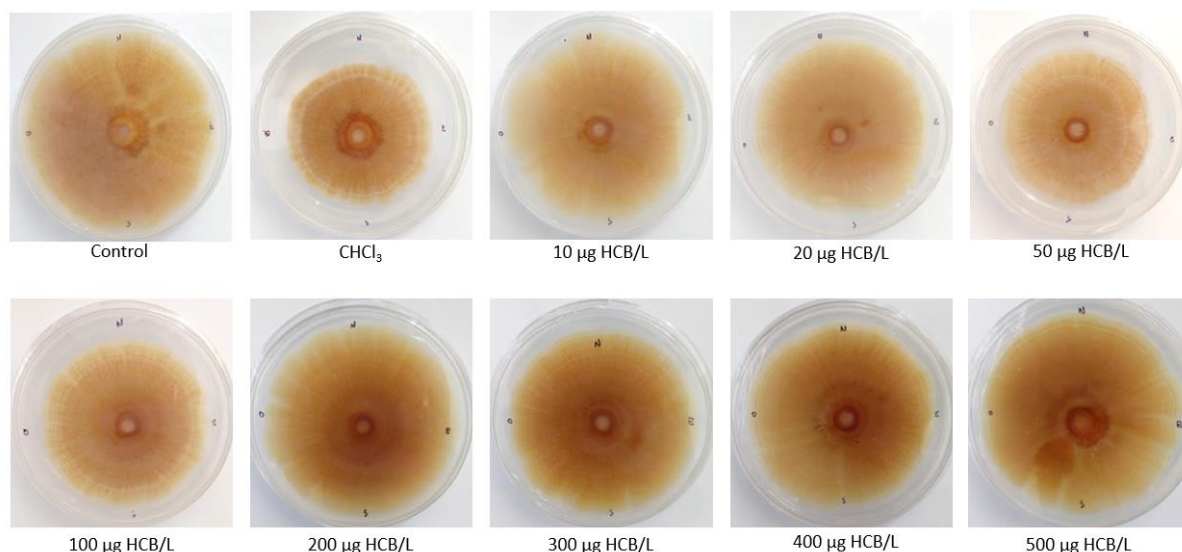


Figura 8. Morfología del crecimiento de *A. pediades* en diferentes tratamientos al día 14.

En la cinética de crecimiento (figura 9) de *A. pediades* en cultivos en medio sólido se observa que la fase de latencia termina alrededor del tercer día, posterior a esto comienza la fase del crecimiento exponencial y termina en el día 20, que es cuando el micelio en el tratamiento control cubrió la superficie de la caja de Petri.

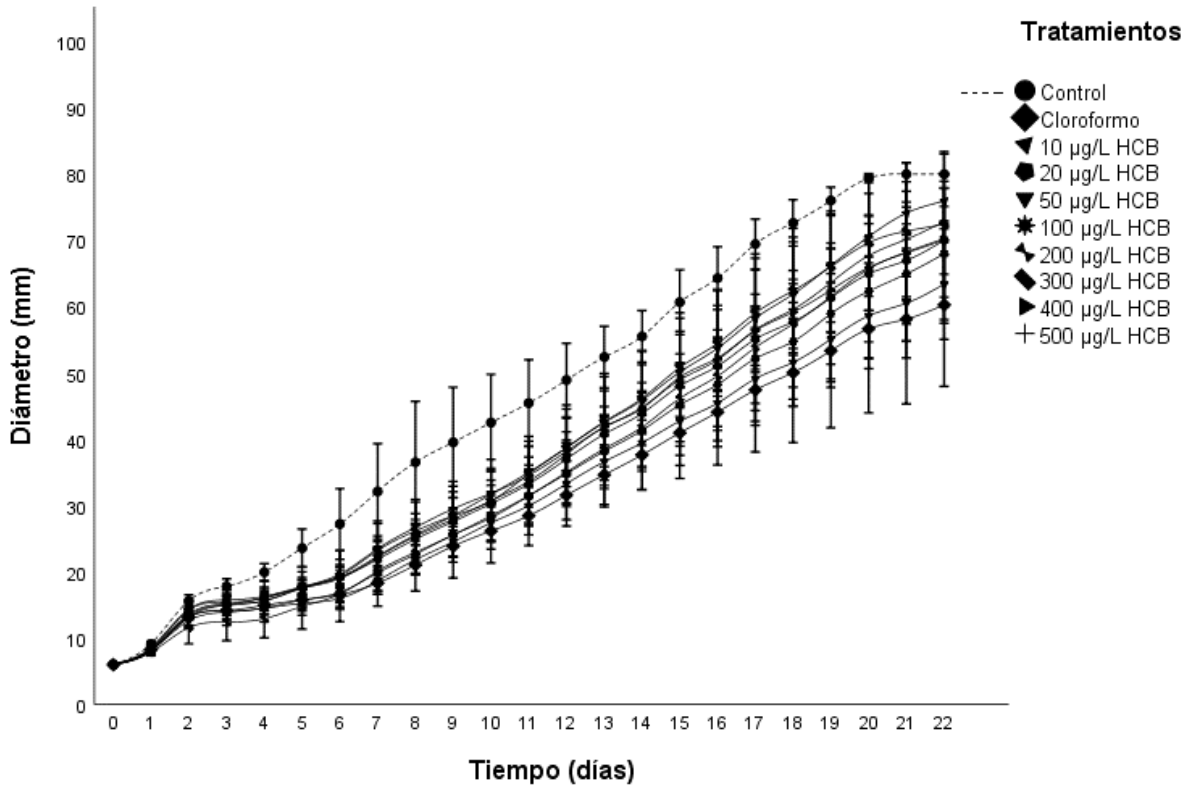


Figura 9. Cinética de crecimiento de *A. pedicels* en cada tratamiento en medio de cultivo mineral compuesto (Télez-Télez *et al.*, 2008). Cada punto representa la media de cinco réplicas \pm desviación estándar (DE).

De acuerdo con la cinética de crecimiento el tratamiento control se desarrolló sobre toda la superficie de la caja Petri durante 20 días de incubación. Los resultados obtenidos del ANOVA y de la prueba post hoc de Tukey que se realizaron con los datos de crecimiento del día 20, indican que los tratamientos con concentraciones de 20, 50, 100, 200 y 400 µg/l de HCB son diferentes con respecto al control, mientras que los tratamientos con 10, 300 y 500 µg/ de HCB y el tratamiento con CHCl_3 son similares con respecto al control (Figura 10).

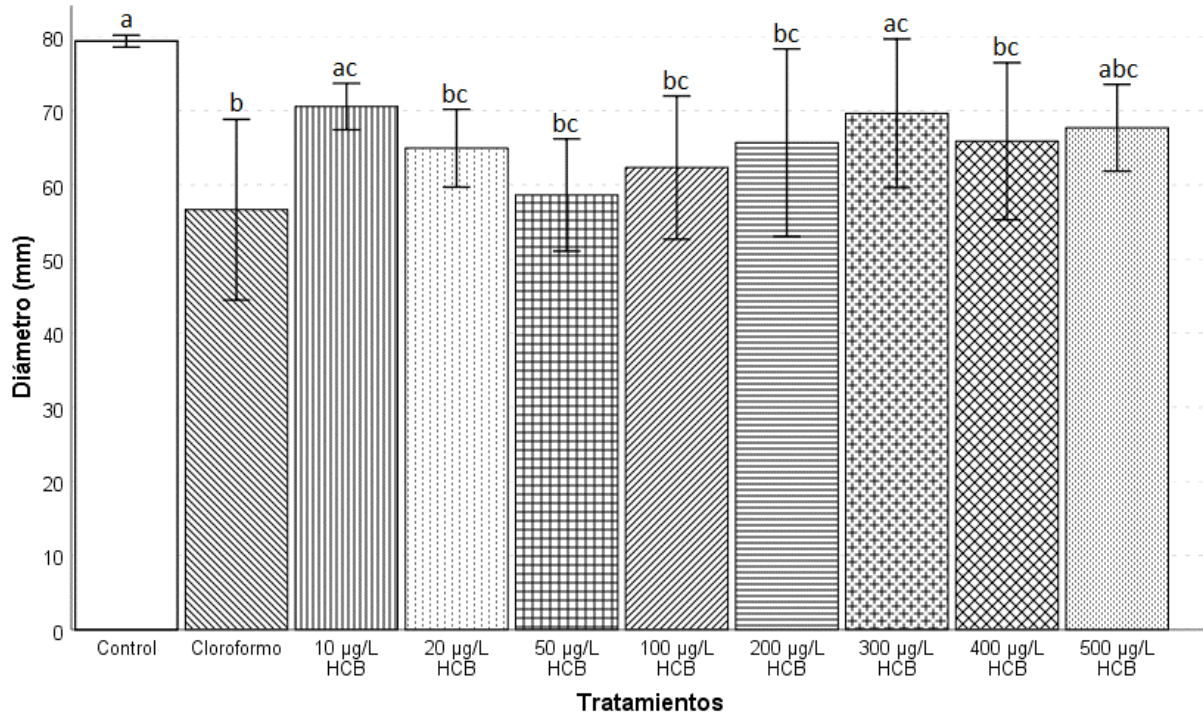


Figura 10. Gráfica del crecimiento micelial de *A.pediades* en el día 20 en medio de cultivo mineral compuesto (Télez-Télez *et al.*, 2008). Cada barra representa la media de cinco réplicas \pm DE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los datos de la velocidad media de crecimiento (VMC) se muestran en la Tabla 7, los valores van de 2.83 mm/día que se obtuvo en el tratamiento con cloroformo hasta 3.58 mm/día en el tratamiento control; el ANOVA señala que no hay diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. Estos resultados indican que la presencia de HCB o de cloroformo no afecta la velocidad con la que crece el hongo en medio sólido.

Tabla 7. Velocidad media de crecimiento de *A. pediadetes* en diferentes tratamientos \pm DE. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey.

Tratamiento	VMC (mm/día)
Control	3.69 \pm 0.33 a
Cloroformo	2.83 \pm 0.88 a
10 μ g/l HCB	3.58 \pm 0.13 a
20 μ g/l HCB	3.25 \pm 0.33 a
50 μ g/l HCB	2.97 \pm 0.54 a
100 μ g/l HCB	3.19 \pm 0.62 a
200 μ g/l HCB	3.42 \pm 0.67 a
300 μ g/l HCB	3.58 \pm 0.53 a
400 μ g/l HCB	3.34 \pm 0.61 a
500 μ g/l HCB	3.33 \pm 0.42 a

7.1.2 En cultivos en medio líquido

La evaluación de tolerancia de *A. pediadetes* en cultivos en medio líquido se realizó mediante la generación de biomasa por peso seco, representada en g/l. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Figura 11. Se observó que la cantidad de biomasa producida en el tratamiento control fue de 1.69 ± 0.06 g/l, de acuerdo con los análisis, la biomasa generada en los tratamientos con 10, 20, 50, 100, 200, 400 y 500 μ g/l de HCB y con cloroformo, es similar con respecto al tratamiento control; en el caso del tratamiento con 300 μ g/l se obtuvo 2.21 ± 0.19 g/l de biomasa, que representa una diferencia significativa con respecto al tratamiento control. A partir de los valores de biomasa de este tratamiento y del tratamiento control se calculó el índice de tolerancia (IT) con la metodología descrita por Ceci *et al.* (2015b), obteniendo un valor de 130.38 %.

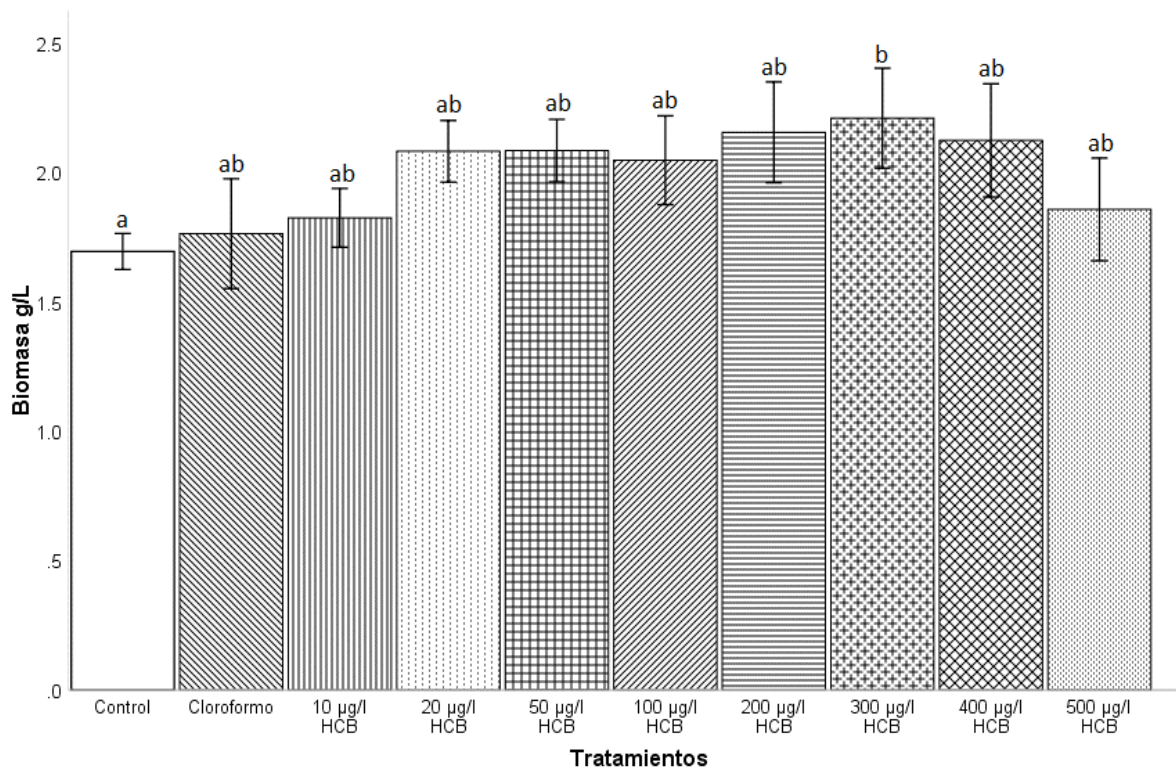


Figura 11. Generación de biomasa de *A. pedicades* en medio líquido al día 13 de crecimiento en cada tratamiento. Cada barra representa la media de tres réplicas \pm DE. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$)

Cuando el índice de tolerancia es mayor a 100 %, refleja un mayor crecimiento del hongo en el tratamiento con 300 µg/l de HCB comparado con el tratamiento control. Esto puede sugerir que el HCB estimula la generación de biomasa posiblemente utilizándolo como fuente de carbono, de tal forma que con una concentración de 300 µg/l de HCB exista una diferencia significativa, pero tal vez a concentraciones mayores tenga un efecto negativo sobre el hongo que no le permita tener un mayor crecimiento.

7.2 Capacidad de *A. pediadetes* para crecer en presencia de HCB mediante cometabolismo

7.2.1 Perfil de pH

El perfil de valores de pH de los medios de cultivo se muestra en la figura 12, el valor del pH inicial fue de 5.5 en todos los tratamientos. En los resultados obtenidos se observa que el valor de pH en el tratamiento control, el tratamiento con cloroformo, y el que tiene HCB con glucosa disminuye aproximadamente 0.7 unidades, manteniéndose el pH en un carácter ligeramente ácido. En el tratamiento que no tiene inóculo el pH se mantiene en 5.5, sin embargo, en el tratamiento que no contiene glucosa, pero si HCB su tendencia fue diferente ya que el pH aumentó aproximadamente 0.6 unidades al final del cultivo, disminuyendo la acidez del medio de cultivo.

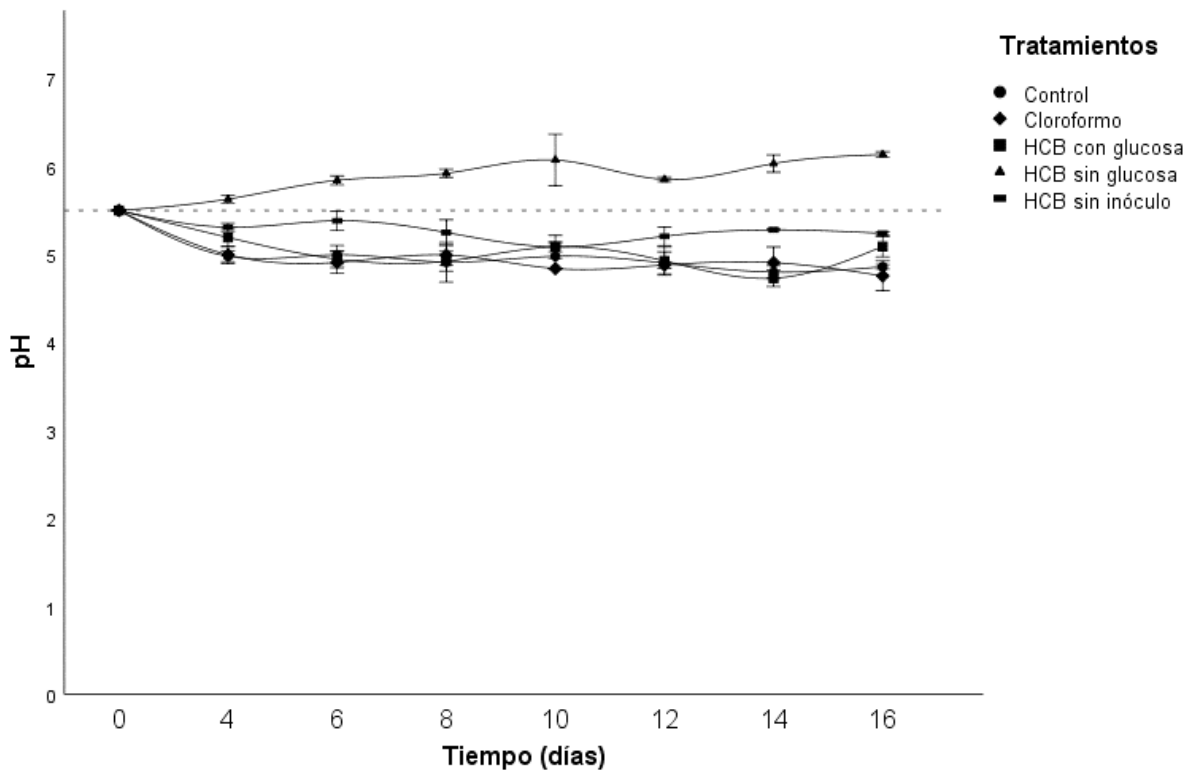


Figura 12. Perfil de pH de los cultivos de *A. pediadetes*. cada punto representa la media de tres réplicas \pm DE.

7.2.2 Generación de biomasa

La cinética de crecimiento de *A. pediades* se muestra en la figura 13, donde se observa que en el tratamiento control la fase de crecimiento exponencial termina aproximadamente al día 10, al igual que en el tratamiento que contiene cloroformo; en el tratamiento que contiene HCB la fase de crecimiento exponencial termina al día 12 y en el caso del tratamiento que no contiene glucosa, pero si HCB el crecimiento exponencial termina en el día 8.

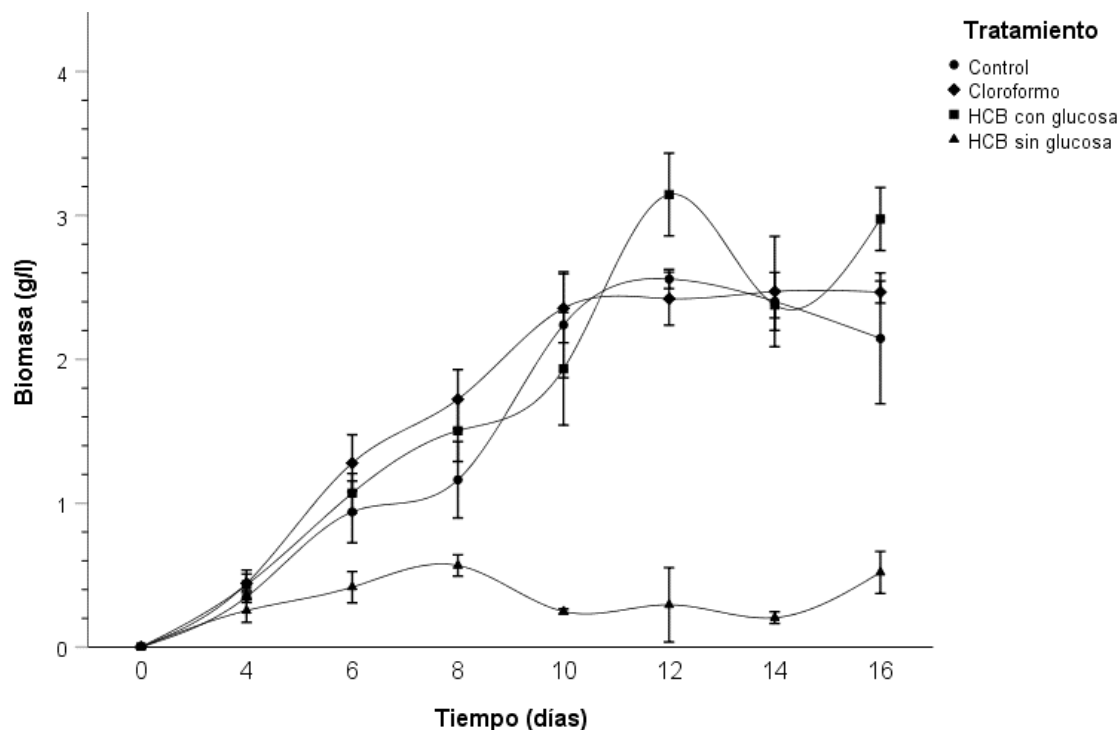


Figura 13. Cinética de crecimiento de *A. pediades* en medio líquido. Cada punto representa la media de tres réplicas \pm DE.

En la tabla 8 se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento (μ), en donde se observa que en el tratamiento control en valor de μ es de $0.0093 \pm 0.0015 \text{ día}^{-1}$, en el tratamiento adicionado con cloroformo y el tratamiento con HCB con glucosa el valor de μ es de 0.0089 ± 0.00067 y $0.0081 \pm 0.00095 \text{ día}^{-1}$, respectivamente, estos dos tratamientos no tienen diferencia significativa con el tratamiento control. En el caso del tratamiento con HCB sin glucosa, el valor de la velocidad específica de crecimiento es de

$0.0051 \pm 0.00145 \text{ día}^{-1}$, este es el único tratamiento en el que la velocidad específica de crecimiento es diferente con respecto al control, de acuerdo con los valores, *A. pedicades* duplica su biomasa en menor tiempo.

Tabla 8. Velocidad específica de crecimiento de *A. pedicades*. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$).

Tratamiento	$\mu \text{ (día}^{-1}\text{)}$
Control	$0.0093 \pm 0.0015 \text{ a}$
CHCl_3	$0.0089 \pm 0.00067 \text{ a}$
HCB con glucosa	$0.0081 \pm 0.00095 \text{ ab}$
HCB sin glucosa	$0.0051 \pm 0.00145 \text{ b}$

7.2.3 Glucosa residual

La glucosa residual se muestra en la figura 14, donde se observa que durante el tiempo de incubación no se consume completamente la glucosa, obteniendo como valores finales de aproximadamente 6 g/l en el medio de cultivo de los tres tratamientos, el control, el adicionado con cloroformo y el que tiene HCB.

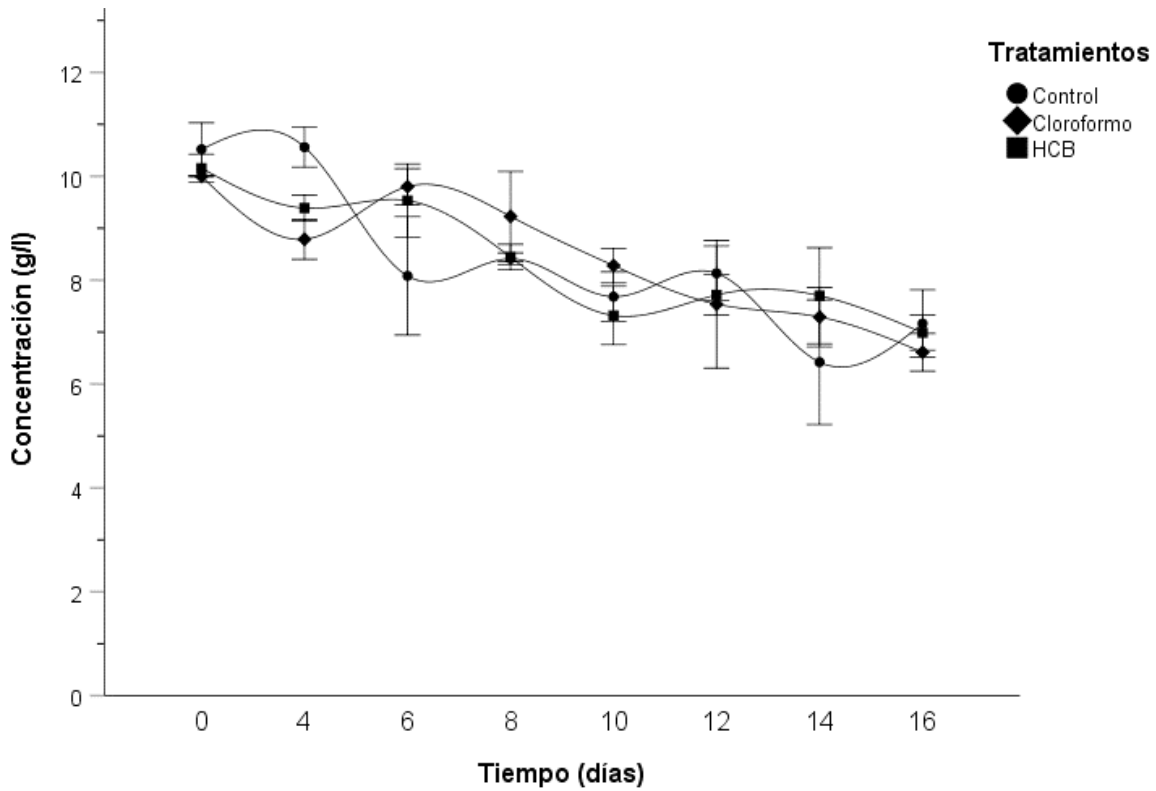


Figura 14. Glucosa residual en el medio de cultivo del tratamiento control, del tratamiento con cloroformo y del tratamiento que contiene HCB con glucosa. Cada punto representa la media de tres réplicas \pm DE.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la biomasa y la glucosa residual del tratamiento con 300 μ g/l de HCB (Figura 15) se observa que la biomasa generada al día 12 de crecimiento, esto podría ser debido a un mayor consumo de glucosa, sin embargo, el consumo es similar con respecto al tratamiento control, además la cantidad de carbono que podría obtener del HCB es insuficiente para generar 0.27 g/l de biomasa.

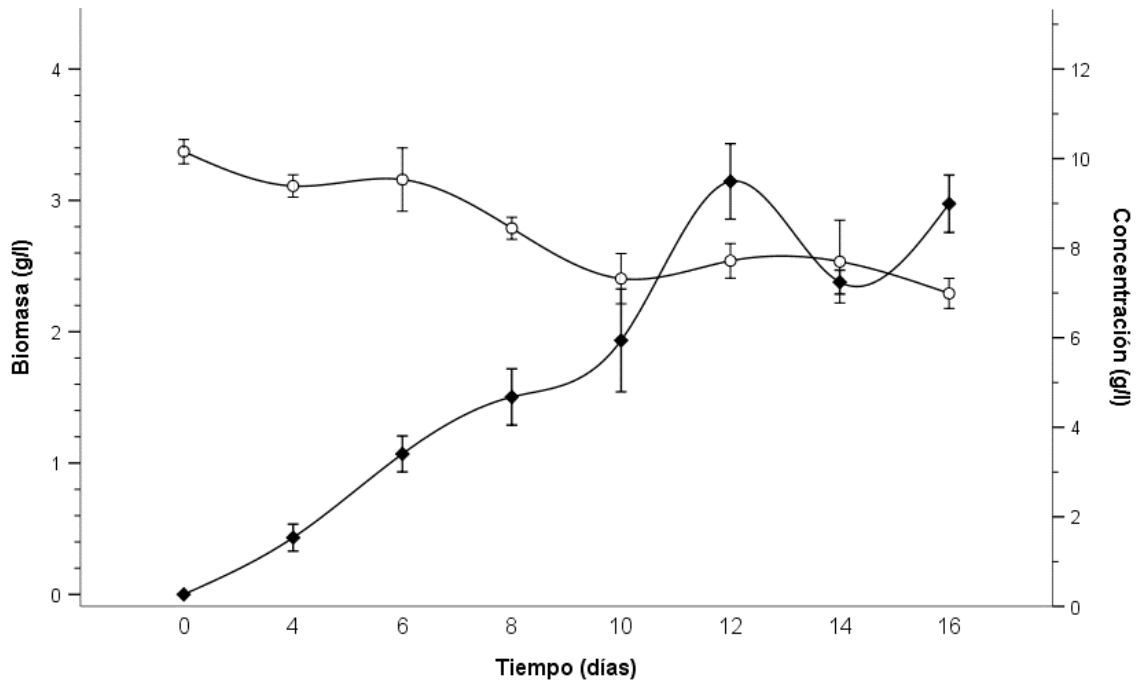


Figura 15. Generación de biomasa (◆) y glucosa residual (○) en el tratamiento con 300 µg/l de HCB. Cada punto representa la media de tres réplicas ± DE.

De acuerdo con los resultados obtenidos, existe evidencia de que *A. pediculus* tiene la capacidad de tolerar la presencia de HCB al mostrar crecimiento en cultivos adicionados con este compuesto tóxico.

8. Discusión

8.1 Evaluación de tolerancia de *A. pediades* a HCB

En las curvas de crecimiento de *A. pediades* en medio sólido se logró observar el crecimiento característico microbiano, de acuerdo con Martínez *et al.* (2015), la fase de latencia está relacionada con la síntesis de enzimas que permiten al hongo utilizar los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo. Posteriormente el hongo entra en la fase de crecimiento exponencial en la que se obtiene la velocidad media de crecimiento y finalmente entra a la fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento disminuye, posiblemente asociada a la acumulación de desechos o a la secreción de algunos compuestos que no permitan el consumo de sustrato para generar mayor cantidad de biomasa.

El hecho de que no existan diferencias significativas en el diámetro final del micelio entre algunos tratamientos con respecto al control puede deberse a que *A. pediades* podría apoyarse de un mecanismo como el cometabolismo para hacer frente a la presencia de un compuesto tóxico como el HCB, mostrando un primer indicio de su capacidad para tolerar y por consiguiente desarrollarse en presencia de HCB, en concentraciones que van de 10 a 500 µg/l. Además, de acuerdo con Coello-Loor *et al.* (2017) los hongos pueden modificar de su metabolismo para poder desarrollarse en determinadas condiciones. Como lo que reporta Matheus *et al.* (2000), donde *Psilocybe* cf. *castanella* es capaz de colonizar suelo contaminado con altas concentraciones de HCB, por otro lado, Camacho-Morales *et al.* (2017), reportan especies de hongos de pudrición blanca como *Polyporus tricholoma*, *Cilindrobasidium laeve* y *Deconica citrispora* que fueron tolerantes al herbicida Paraquat. Además, se han reportado hongos filamentosos del género *Aspergillus* sp con capacidad de tolerar y crecer en medio de cultivo con bifenilos policlorados (García-Cuán *et al.*, 2017).

De acuerdo con los valores de la velocidad media de crecimiento no hay diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, esto puede indicar que *A. pediades* tiene la capacidad para desplegar un mecanismo que le permita crecer a la misma velocidad cuando se encuentra el HCB en el medio de cultivo y cuando está

ausente, sin embargo, también puede deberse a la concentración utilizada, posiblemente a mayor concentración se podría presentar algún efecto en el crecimiento. En un estudio realizado por Ceci *et al.* (2015a), reportaron el potencial de *Penicillium griseofulvum*, un hongo saprófito del suelo, para tolerar y biotransformar sustancias tóxicas como el β -hexaclorociclohexano, en donde encontraron que la adición de 1 ml/l de β -HCH no afectó negativamente el crecimiento de este hongo con respecto al control, de tal forma que *P. griseofulvum* es descrito como un hongo tolerante. Posteriormente Ceci *et al.* (2018) realizaron otro estudio con *P. griseofulvum* para examinar el potencial ecológico y biorremedial de este hongo verificando la presencia de mecanismos que le permitan transformar metales e isómeros de HCH bajo condiciones extremas, donde utilizaron una concentración de 4 ml/l de isómeros de HCH, los cuales tampoco causaron efectos adversos obvios en el crecimiento del hongo, sin embargo la adición de 50 mg/l de la mezcla de isómeros de HCH al medio de cultivo, tuvo un efecto tóxico sobre el crecimiento de *P. griseofulvum* ya que el rendimiento de la biomasa fue menor al 25 % con respecto al control.

En el presente estudio, se observa que *Agrocybe pediades*, un hongo aislado de un ambiente perturbado (Ortega, 2018), tiene la capacidad de crecer en presencia de hexaclorobenceno en concentraciones de hasta 500 $\mu\text{g/l}$ de HCB, tanto en medio sólido como en medio líquido, se sabe que existen estudios que describen la capacidad de algunos basidiomicetos para tolerar concentraciones de hasta 5 y 25 g de HCB por kilogramo de suelo. Algunos de los hongos que se han descrito con esta capacidad fueron aislados de zonas altamente contaminadas con este compuesto (Matheus *et al.* 2000). En el presente estudio no se puede descartar que *A. pediades* sea tolerante a concentraciones mayores de HCB, puesto que en 500 $\mu\text{g/l}$ crece de manera similar al control en sólido, sin embargo, en los estudios *in vitro* el manejo de tan altas concentraciones puede implicar también una mayor exposición no sólo por el hongo, sino por quienes realizan los experimentos y no se justifica si se considera que en el ambiente en el que se podría diseñar un proceso de eliminación de HCB, la concentración máxima descrita hasta este momento en el estado de Tlaxcala es de 450 $\mu\text{g/l}$ (Juárez-Santacruz, *et al.*, 2013).

Uno de los basidiomicetos que se ha reportado con la capacidad de tolerar altas concentraciones de HCB pertenece a la misma familia de *A. pediades*. Si bien aún existe información desconocida sobre este organismo y de algunos otros, se sabe que dentro de la filogenética en micología algunas de las características utilizadas con el fin de dilucidar las relaciones entre los organismos son morfológicas, anatómicas, ultraestructurales, secuencias de ácidos nucleicos y bioquímicas, en estas últimas se evalúan principalmente asimilación y fermentación de carbohidratos, producción de metabolitos secundarios y enzimas (Cepero *et al.* 2012), por lo que es posible que *A. pediades* cuente con un mecanismo de defensa que involucre la asimilación de HCB como el de otros hongos bajo estas condiciones (Matheus *et al.*, 2000), además de que no se descarta la presencia de otros COP en la zona de donde fue aislado el organismo.

De acuerdo con la biomasa obtenida en cultivos realizados en medio líquido, el tratamiento control tuvo una diferencia significativa únicamente con el tratamiento con la concentración de 300 µg/l de HCB, en el cual la biomasa fue un 30 % mayor respecto al control. Se han reportado índices de tolerancia para el hongo *P. griseofulvum* de 74.01 % y 87.2 % en medios de cultivo con 1 y 4 mg/l de HCH, respectivamente, así como índices de tolerancia de hasta 231.5 % en presencia de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) (Ceci *et al.*, 2015a; Ceci *et al.*, 2018). Cuando el valor del índice de tolerancia es mayor que en el control, el crecimiento suele estar relacionado con los mecanismos de tolerancia, sean dependientes o no del metabolismo, desplegados para hacer frente al estrés ocasionado por la presencia de compuestos tóxicos.

8.2 *A. pediades* y cometabolismo con HCB

El pH de tres de los tratamientos que contienen glucosa se acidificó, mientras que en el tratamiento que no fue inoculado la variación en el pH fue menor. En general, los hongos pueden modificar el pH del medio de cultivo durante su crecimiento mediante diferentes mecanismos como el intercambio de nutrientes catiónicos por protones o por la producción de ácidos orgánicos, derivados del consumo de la

glucosa como el ácido cítrico, el ácido glucónico y el ácido itacónico (Vázquez-García *et al.*, 2002; Deacon, 2006; Pereira *et al.*, 2014).

Si bien no se han descrito los metabolitos que este hongo produce, no se descarta la producción de algunos ácidos ya que como en presencia de glucosa el pH del medio de cultivo tiende a ser más ácido, lo cual puede ser explicado por la producción de compuestos ácidos, además de que se ha descrito que la secreción de este tipo de compuestos es una importante característica de los hongos, ya que las células fúngicas deben de regular su pH interno (Deacon, 2006; Cepero de García *et al.* 2012)). Asimismo, muchos hongos filamentosos pueden alterar su pH externo local mediante la absorción selectiva y el intercambio de iones (NO_3^- o $\text{NH}_4^+ / \text{H}^+$), o mediante la excreción de ácidos orgánicos para tener un buen funcionamiento celular, ya que la permeabilidad celular puede ser alterada por la acidez o alcalinidad del medio de cultivo (Cepero de García *et al.* 2012).

Por otro lado, cuando el medio de cultivo no contiene glucosa, pero si un compuesto tóxico, es posible que el hongo modifique su metabolismo para poder crecer en esas condiciones como lo reportan Ceci *et al.* (2018), donde el hongo *P. griseofulvum* aumentó el valor del pH hasta 0.72 y 1.10 unidades cuando el medio de cultivo era adicionado con metavanadato de amonio (NH_4VO_3) y HCH, respectivamente, disminuyendo la acidez del medio de cultivo, como sucede en el tratamiento que no contiene glucosa pero si HCB en el que los valores de pH cambiaron de 5.5 hasta 6.13. Este cambio de pH puede deberse a una estrategia del hongo para evitar posibles efectos tóxicos de este compuesto en un pH ácido (Ceci *et al.*, 2015a; Ceci *et al.*, 2018). Por lo tanto, las modificaciones en el pH de los diferentes tratamientos están relacionadas con una estrategia que tiene el hongo para poder regular el medio en el que desarrolla.

Los hongos pueden desarrollar diversas estrategias de vida para hacer frente al entorno en el que habitan. En el comportamiento de los hongos existen dos modelos, uno de estos involucra tres factores principales: la incidencia de competidores (C), la perturbación (R) y el estrés (S) (Cepero de García *et al.*, 2012). La selección C se caracteriza por la habilidad de

los hongos para competir dependiendo de su crecimiento en ambientes no perturbados; la selección R está relacionada con ciclos de vida cortos en ambientes perturbados pero con propiedades suficientes para el desarrollo de los hongos; la selección S, definida como una estrategia de tolerancia al estrés, se caracteriza por la selección de adaptaciones que permitan tolerar al hongo condiciones ambientales de estrés así como la falta de recursos, en ésta el crecimiento de estos hongos no necesariamente es rápido (Cepero de García *et al.*, 2012; Boddy e Hiscox, 2016). En el caso de *A. pediades*, se puede presentar una relación predominante entre las características R y S, ya que cuando incrementa la perturbación también incrementa el estrés, además, de que fue aislado de un bosque que ha sido afectado por perturbaciones lo cual hace que sea un organismo tolerante al estrés. Esto también se evidencia cuando es cultivado en presencia de HCB, compuesto que puede ser considerado como un factor de estrés a diferencia del tratamiento control.

En la cinética en medio líquido, se observa que la biomasa generada en el tratamiento que tiene glucosa y HCB en el día 12 y 16 es mayor que en el resto de los tratamientos lo que puede indicar que el hongo posiblemente cuenta con estrategias como la producción, ya sea de enzimas específicas o de complejos enzimáticos, con las cuales es posible reconocer al contaminante como sustrato (García-Rivero y Peralta-Pérez, 2008), algo similar es reportado por Sagar y Singh (2011) quienes observaron que el crecimiento de *Fusarium poae* y *F. solani* incrementó en presencia de 100 µg/mL de lindano, por lo que sugieren que al ser especies aisladas de sitios contaminados tienen la potencial capacidad de degradar el lindano para utilizarlo como fuente de carbono. *A. pediades* podría presentar un comportamiento parecido, sin embargo, la cantidad máxima de carbono del HCB que podría ser consumido por el hongo es de 0.0759 mg, mientras que la cantidad necesaria para poder atribuir la diferencia del crecimiento que existe entre el tratamiento control y el tratamiento con HCB es de 271.4 mg aproximadamente. La gran diferencia que existe en el crecimiento puede ser debido a que el hongo utiliza los nutrientes residuales de los cilindros de agar con los que fue inoculado cada matraz, sin embargo, también existe la posibilidad de

que pueda utilizar al HCB como fuente de carbono debido a que no se descarta la presencia de HCB del sitio donde fue aislado. Además, de acuerdo con la cuantificación de glucosa consumió menos del 40 % de ésta, el método utilizado se basa en la detección de azúcares reductores, considerando esto y que en un estudio realizado por Ferrer-Romero *et al.* (2019) en el que analizaron el crecimiento de *P. ostreatus* así como el consumo de glucosa, éste hongo consumió aproximadamente el 77 % de la glucosa disponible en 9 días, sin embargo también observaron que en la curva de glucosa hubo un aumento en la concentración que es asociado a la secreción de exopolisacáridos que pueden contener residuos de monosacáridos. Algunos de estos residuos de monosacáridos presentes en el medio de cultivo que contenía glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno fueron glucosa, manosa, galactosa y glucosamina. Si bien no se trata de la misma especie, no se descarta la posibilidad de que *A. pediades* también secrete este tipo de compuestos que hayan afectado la cuantificación de glucosa y por lo tanto sería consistente con la diferencia que se observa entre el consumo de glucosa y la generación de biomasa en el tratamiento que contiene HCB.

De acuerdo con los resultados de biomasa y del consumo de glucosa, se puede observar que, aunque la biomasa llegó a la fase estacionaria, no se consumió la totalidad de la glucosa, esto puede deberse a que cuando el sustrato se encuentra en exceso puede afectar el crecimiento, además, conforme en el medio de cultivo se acumulan desechos o algunos compuestos que secreta el hongo, la generación de biomasa se ve afectada, llegando a limitar el crecimiento.

Tomando en cuenta que *A. pediades*, tiene la capacidad para tolerar y crecer en presencia de HCB, así como lo descrito por Torres en el año 2017, sobre la capacidad de este hongo para producir enzimas con actividad lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) en medios de cultivo sin la presencia de algún contaminante orgánico persistente, es posible que el cometabolismo sea el mecanismo mediante el cual puede desarrollarse en presencia de HCB, ya que la producción de estas enzimas se ha relacionado con la síntesis de pigmentos, la oxidación inicial de lignina, entre otras funciones (Thurston 1994, Hofrichter 2002), además, en

algunos estudios, como el realizado por Pozdnyakova *et al.* (2018) en el que se ha relacionado su participación en la degradación de compuestos xenobióticos, por lo tanto, se podría decir que las enzimas con actividad lacasa y MnP que produce *A. pediades* son enzimas no específicas y podrían ser parte del proceso de cometabolismo mediante el cual se este transformando el HCB.

9. Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos, el hongo *Agrocybe pediades* tiene la capacidad de tolerar y crecer en presencia de hexaclorobenceno con concentraciones de 10 hasta 500 µg/l, en medio sólido, mientras que, en cultivo líquido presentó un mayor crecimiento cuando en el cultivo contenía HCB en una concentración de 300 µg/l.

El mecanismo que podría estar utilizando es el cometabolismo, ya que produce enzimas relacionadas con la degradación de xenobióticos y de acuerdo con los resultados obtenidos, la presencia de HCB no causó un efecto adverso en el crecimiento de *A. pediades*.

10. Recomendaciones

Realizar un cultivo eliminando la mayor cantidad posible de agar para reducir el margen de error en cuanto a la generación de biomasa.

Realizar la cuantificación por CG-MS de HCB en diferentes etapas del cultivo para identificar si existe una disminución en la concentración de éste, y si lo estuviera transformando reconocer los subproductos del HCB derivados de este proceso.

También sería conveniente realizar la determinación de iones de cloruro (Cl⁻) para determinar si se está transformando o degradando el HCB, o el hongo lo está absorbiendo, lo que puede ser también un paso previo a la transformación del compuesto.

Determinar si secreta compuestos de carácter ácido en presencia de glucosa y que tipos de compuestos secreta cuando no tiene una fuente de carbono más que un compuesto tóxico.

Analizar la capacidad de crecimiento con otros COP.

11. Literatura citada

- Adrian L., Gopalakrishnan J., Helmut G. 2003. Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Microbiol*, 180: 411-416
- Agencia para Sustancias Toxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2002. Statement for DDT, DDE, and DDD. Public Health Statement for Hexachlorobenzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health. US Public Health Service, Atlanta.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2019. Toxicological Profile for Hexachlorobenzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service
- Albert, L. A. 1997. Introducción a la toxicología ambiental. Contaminantes orgánicos persistentes Disponible en: <<http://www.bvsde.paho.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-04a20.pdf>> Consultado el 31 de octubre de 2018. p. 333 -358.
- Alexopoulos, C. J. y Mims, C. W. 1985. Introducción a la micología. Ediciones Omega. Barcelona.
- Álvarez, L. A. 2011. Identificación, conservación y conformación de un banco de hongos filamentosos aislados previamente de Los Páramos de Cruz Verde y Guasca. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javerana.
- Amador-Muñoz, O., Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini, R., Munive-Colín, Z., Ortiz-Martelo, R., Díaz-González, G., Bravo-Cabrera, J. L., Gómez-Arroyo, S. 2001. Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17 (4): 193-204.

- Andrade-Ribeiro A. L. F. A., Pachecho-Ferreira A., Cynara L. N. C., Mendes-Kling A. S. 2006. Disruptores endocrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Rev. Biomed.* 17:146-150
- Andrade, F. H., 2016. Los desafíos de la agricultura. Balcarce, Argentina.
- Arbeli Z. 2009. Biodegradación de Compuestos orgánicos persistentes (COP): I. el caso de los bifenilos policlorados (PCB). *Acta biológica Colombiana.*: 14(1): 57-88.
- Arroyo P., Suarez J. I., Lozano J., Herrero J. L., Carmona P. 2018. Nariz electrónica personal para la detección de contaminantes en el aire. Memoria de la XXXIX Jornada de Automática, Universidad de Extremadura. Badajoz, Extremadura, España. 5 al 7 de septiembre.
- Ashraf M. A. 2017. Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge *Environ Sci Pollut Res* 24: 4223-4227. Bartolomé J
- Bartolomé, M. J. 2015. Análisis de contaminantes orgánicos en muestras biológicas humanas con técnicas cromatográficas. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Analíticas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Bello D., Carrera E. y Díaz Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los derivados de caña de azúcar.* XL (2) 45-50.
- Bills, G. F. y Gloer, J. B. 2018. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fung. En: *The Fungal Kingdom*. ASM Press Washington, DC. pp. 1087-1119
- Boddy, L. e Hiscox, J. 2016. Fungal Ecology: Principles and Mechanisms of Colonization and Competition by Saprotrophic Fungi. En: *The Fungal Kingdom*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC. pp. 293-308.

- Bourett, T. M., James, S. W. y Howard, R. J. 2007. The edomembrane system of the fungal cell. En: *The mycota: Biology of the fungal cell*. Vol. VIII. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-48
- Camacho-Morales, R. L., Gerardo-Gerardo, J. L., Navarro, K. G. y Sánchez, J. E. 2017. Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de microbiología*. 49 (2): 189-196.
- Cárdenas, L. A. 2017. Biodegradación de hidrocarburos de fracción pesada en suelo, por hongos ligninolíticos inmovilizados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco.
- Ceci, A., Pierro, L., Riccardi, C., Pinzari, F., Maggi, O., Persiani, A. M., Gadd, G. M., Papini, M. P. 2015a. Biotransformation of β -hexachlorocyclohexane by the saprotrophic soil fungus *Penicillium griseofulvum*. *Chemosphere*. 137:101-107.
- Ceci, A., Rhee, Y. J., Kierans, M., Hillier, S., Pendrowski, H., Gray, N., Persiani, A. M., Gadd, G. M. 2015b. Transformation of vanadinite [Pb₅(VO₄)₃Cl] by fungi. *Environmental Microbiology* (2015) 17(6): 2018–2034.
- Ceci, A., Pinzari, F., Riccardi, C., Maggi, O., Pierro, L., Petrangeli, P. M., Michael, G., Persiani, A. M. 2018. Metabolic synergies in the biotransformation of organic and metallic toxic compounds by a saprotrophic soil fungus. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102:1019–1033.
- Cepero de García, M. C., Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, M., Vargas, N. 2012. *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes. Bogotá, Colombia.
- Coello-Loor, C. D., Avellanda-Cevallos, J. H., Barrera-Álvarez, A. E., Peña-Galeas, M. M., Yépes, P. F., Racines-Macías, E. R. 2017. Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género *Pleurotus* spp., cultivadas

- en un medio agar con diferentes sustratos. *Ciencia y Tecnología* 10(2): 33-39.
- Colina, J. V. 2000. Tipos de contaminación, sus fuentes y efectos en el estuario de Santoña. *Monte Buciero*, (5): 211-224.
- Crowther, T. W., Boddy, L. y Jones, T. H. 2012. Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. *The ISME journal*, 6(11): 1992–2001. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.53>
- Cuesta, J. 2003. Ecología de los hongos (1ª parte). *Foresta*, (23), 22-35.
- Deacon, J. 2006. *Fungal biology* (4th edition ed.). Blackwell.
- de Navarra, G. G. (2000). Prevención de riesgos laborales en el sector agrario. Unidad didáctica 17: Explotaciones pecuarias. Instituto Navarro de Salud Laboral. (En línea) Disponible en <http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/2EFDBE3F-EA49-4BDE-9CFB-7EEF169F4ECA/0/m2ud2.pdf>. (26 de junio de 2020).
- Dhavale, T. y Jedd, G. 2007. The Fungal Woronin Body. En: *Biology of the fungal cell. The Mycota VIII*. Springer-Verlag. Berlin. 2da Edición. pp. 87-96.
- EarthFax Engineering Group. 2013. EarthFax. (En línea) Disponible en earthfax.com (3 de noviembre de 2018)
- Estévez, M. J. y Kopyto, M. 2015. La biodegradación de pesticidas organoclorados en un suelo contaminado proveniente de una antigua zona aldonera. *Revista Digital Apuntes de Investigación*. 11.
- Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego. S. M., Beltrán-Delgado, Y., Morris-Quevedo, H. J., Díaz-Fernández, U. 2019. Estudio cinético de la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida. *Revista Cubana de Química*. 31 (1): 16-30.

- Fitzpatrick, D. y Medina, E. M. 2011. Fungal Genomics. En: Kavanagh, K. (Ed.). Fungi: Biology and Applications. Wiley & Sons. West Sussex, UK. 2da Edición. pp. 67-93
- Fricker, M., Boddy, L., Bebbler, D. 2007. Network Organisation of Mycelial Fungi. En: En: Biology of the fungal cell. The Mycota VIII. Springer-Verlag. Berlin. 2da Edición. pp. 309-330
- García, F. 2016. Compuestos orgánicos tóxicos. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. España. (En línea) Disponible en https://www.ugr.es/~fgarciac/pdf_color/tema11%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf (26 de julio de 2020)
- García, J. A. 2018. Estado del arte de los contaminantes orgánicos persistentes (COP) en Colombia entre los años 2007-2017. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias y Educación. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- García-Rivero, M. y Peralta-Pérez, M. R. 2008. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 7(1):1-12.
- Gavilán A., Castro J. 2007. Dioxinas, furanos y hexaclorobenceno. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Disponible en: <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/447/cap3.html>> Consultado el 31 de octubre de 2018.
- Godoy, P. 2019. Generalidades sobre micología. En: Manual de infecciones fungicas sistémicas. Recursos fotográficos. Córdoba, Argentina. Tercera edición. pp. 1-20.
- Gouin T., Mackay D., Jones K.C., Harner T., Meijer S.N., 2004. Environmental Pollution. Evidence for the “grasshopper” effect and fractionation during long-range atmospheric transport of organic contaminants 128: 139-148.

- Henn, C., Monteiro, D. A., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E. 2020. Biodegradation of atrazine and ligninolytic enzyme production by basidiomycete strains. *BMC Microbiology*. 20 (266): 1-20.
- Herrera T., Pérez-Silva E., Valenzuela V. 2006. Nueva contribución al conocimiento de los macromicetos de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, D.F., México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77: 51-57.
- Herrero, M. 2012. Bioacumulación de plaguicidas organoclorados en tejido adiposo, lípidos séricos maternos y de cordón umbilical. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biomédicas. Universidad veracruzana.
- Hofrichter M. (2002). Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Howsam, M., Grimalt J. O., Guinó E., Navarro M., Martí-Ragué J., Peinado M. A., Capellá G., Moreno V. 2004. Organochlorine Exposure and Colorectal Cancer Risk. *Environmental Health Perspectives*, 112(15): 1460-1466.
- Ibáñez-Moreno, X. W., Arcos-Logroño, J. P., Méndez-Zambrano, P. V. 2020. Degradación de pesticidas organoclorados mediante la aplicación de nanopartículas de TiO₂ y sus posibles aplicaciones. *Revista científica Dominio de las Ciencias*, 6(2): 803-834.
- Kab-Yeul J., Soo-Muk C., Soon-Ja S., Won-Sik K. 2009. Screening of Biodegradable Function of Indigenous Ligno-degrading Mushroom Using Dyes. *Mycobiology*, 37(1): 53-61.
- Juárez-Santacruz L., García-Nieto E., Costilla-Salazar R., García-Gallegos E., Coronel-Olivares C., Gómez-Camarillo M., Gaytán-Oyarzún J. 2013. Assessment of the Genotoxic Potential of Sediments Contaminated with POPs and Agricultural Soils Using *Vicia faba* Micronucleus Assay. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22:3, 288-300.
- Kolowski, T. T., Pallardy, S. G. 1997. Growth control in woody plants. Academic Press. 641 pp.

- Liu X., Fielder H., Gong W., Wang B., Gang Y. 2018. Potential sources of unintentionally produced PCB, HCB, and PeCBz in China: A preliminary overview. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 12(6): 1–14.
- Lu Y., Wang G., Han J., Luo W., Shi Y., Wang T., Sun Y. 2010. Hexachlorobenzene sources, levels and human exposure in the environment of China. *Environment International* 36: 122–130
- Luna-Fontalvo, J., Borja, R. I. R., Vera, R. S. 2017. Recuperación de suelos contaminados con toxafeno a través de sustratos orgánicos pretratados con hongos. Agencia de medio ambiente.
- Manzano L., A. M., Sánchez M. I., Ramos M., Torres G., Guerra G. 2014. Tratamiento biológico de efluentes con basidiomicetos ligninolíticos para la degradación de colorantes textiles a escala de laboratorio. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 4(2): 1-7.
- Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., Reynoso, L. C., Rodríguez, G. E., Agüero, M. S. 2015. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita*. *Anales de Biología*. 37:1-10.
- Martínez, Z., González, M., Paterina, M., Cantero, M. 2017. Contaminación de suelos agrícolas por metales pesados, zona minera El Alacrán, Colombia. *Temas agrarios*,(2): 21-31.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., Gutiérrez, A. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 39(1): 27-36.
- Matheus, D. R., Bononi, V.L.R. y Machado, K.M.G 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 415-421.

- Mendoza-Cantú, A., e Ize-Lema, I. A. R. 2017. LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS EN MÉXICO. PERSPECTIVAS PARA UN MANEJO ADECUADO. Revista internacional de contaminación ambiental, 33(4): 719-745
- Miren. 2006, 23 de enero. Cadena trófica. La desaparición de un ser vivo repercute en el resto de seres relacionados con él. Eroski Consumer
- Mukaremera, L. y Nielsen, K. 2017. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. Journal of Fungi. 3 (64): 1-20.
- Newhook R. y Dormer W. 1997. Hexachlorobenzene. International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization (WHO). Geneva. Disponible en: <<http://www.inchem.org/documents/ehec/ehec/ehec195.htm>> Consultado el 31 de octubre de 2018.
- OMS, 2016, 4 de octubre. Las dioxinas y sus efectos en la salud humana. Organización Mundial de la Salud.
- Ortega, A. R. 2018. Aislamiento, identificación, crecimiento in vitro y conservación de basidiomicetos saprófitos de un bosque de Juniperus del estado de Tlaxcala. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Peña-García, Y., 2016. Degradación microbiana de compuestos xenobióticos. Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación. Sección de Ciencias Biológicas y Químicas. Numero 48.
- Pereira, G., Campos, J. L., Chávez, D., Anabalón, L., Arriagada, C. 2014. Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrízico *Lactarius aff. deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. Quebracho - Revista de Ciencias Forestales. 22 (1-2): 30-39.
- Pimentel-González, D. J., Rodríguez-Huezo, M. E., Campos-Montiel, R. G., Trapala-Islas, A., Hernández-Fuentes, A. D. 2011. Influencia de la variedad de maíz en las características fisicoquímicas del huitlacoche (*Ustilago maydis*). Revista Mexicana de Ingeniería Química. 10 (2): 171-178

- Pozdnyakova N., Schlosser D., Dubrovskaya E., Balandina S., Sigida E., Grinev V., Turkovskaya O., 2018. The degradative activity and adaptation potential of the litterdecomposing fungus *Stropharia rugosoannulata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34:133.
- Reategui, K. 2017. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos durante la combustión espontánea del carbon. Caracas. Venezuela.
- Ritter, L., Solomon, K. R., Forget, J., Stemeroff, M., O'Leary, C. 1995. Persistent organic pollutants. An assessment report on: DDT – Aldrin – Dieldrin – Chlordane – Heptachlor – Hexachlorobenzene – Mirex – Toxaphene, Polychlorinated Biphenyls, Dioxins and Furans. The International Programme on Chemical Safety. (IPCS) – Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC). Disponible en: < https://www.who.int/ipcs/assessment/en/pcs_95_39_2004_05_13.pdf > Consultado el 07 de enero de 2020.
- Rojas, V. G. 2010. Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en nuevo león. Tesis de doctorado en biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rojas, L. 2013. Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoría con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*. 17 (1): 49-55.
- Sagar, V. y Singh, D. P. 2011. Biodegradation of lindane pesticide by non white-rots soil fungus *Fusarium sp.* *World J Microbiol Biotechnol*. 27:1747–175.
- Sánchez, M. B., Uribe, C., Gutierrez, R., Pérez, R., Valle, P. 2018. Contaminación de los ambientes acuáticos generados por la industria textil. *Revista Campus*, 23(26): 129-143.
- Sanz, T. P., 2013. Interacciones dieta-xenobióticos en las etapas de la vida y situaciones fisiológicas. *Salud en nutrición y alimentación*. Instituto Tomás Pascual Sanz. (En línea) Disponible en <https://www.institutotomas Pascualsanz.com/interacciones-dieta->

xenobioticos-en-las-etapas-de-la-vida-y-situaciones-fisiologicas/. (22 de julio de 2020)

Seku, C. B., 2015. Fungicidas. En: Reconocimiento y Manejo de Los Envenenamientos por Pesticidas. Quinta Edición. pp. 152-171

SEPA. 2007. China's National Implementation Plan for the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. State Environmental Protection Administration of China. Disponible en: <<http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-NIP-UK-COP5.English.pdf>> Consultado el 31 de octubre de 2018.

Stockholm Convention Secretariat. 2019. The 16 New POPs

Strasburger, E.; Noll, F.; Schenck, H. & Schimper, A. F. W. 2002. Tratado de Botánica. Ediciones Omega, Barcelona. 1134 pp

Sussmann, P. O. A., Mattos, L., Restrepo, A. 2001. Resistencia Bacteriana. Hospital Universitario San Ignacio. Unidad de infectología. Bogotá-Colombia 43:91.

Tejedor, Ma. C., 2008. Introducción a la bioquímica ambiental. Bioquímica ambiental. Licenciatura en química. Universidad de Alcalá. (En línea) Disponible en http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/T2.htm#:~:text=Contaminantes%20org%C3%A1nicos%3Aplaguicidas%20y%20compuestos,inorg%C3%A1nicos%3A%20metales%20pesados%20y%20%C3%B3xidos.&text=Los%20xenobi%C3%B3ticos%20son%2C%20por%20lo,funcionamiento%20de%20las%20c%C3%A9lulas%20vivas. (22 de julio de 2020)

Téllez-Téllez, M., Fernández, J. F., Montiel-González, A.M., Sánchez, C. y Díaz-Godínez, G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675-679,

- Thurston, C. F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140(1): 19-26.
- Torres, D. G., 2017. Evaluación de la expresión de enzimas ligninocelulolíticas de dos especies de hongos saprófitos aislados de un bosque de *Juniperus* en Tlaxcala. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Varela, A. S. 2010. Aspectos básicos de la fisiología en respuesta a estrés y el clima como condicionante del mismo en las plantas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Vargas-Hernández, J., Barrón-Baza, G. A., García-Garcilazo, J. E., Soriano-Silverio, K. 2016. Síntesis de nanopartículas de TiO₂ con alta área superficial para degradación de contaminantes en agua. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*. 2(4): 27-32.
- Vázquez-García, A., Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*. 73 (1): 1-15.
- Vullo, D. L. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2(3):93-104.
- Walker, G. M. y White, N. A. 2011. Introduction to Fungal Physiology. En: Kavanagh, K. (Ed.). *Fungi: Biology and Applications*. Wiley & Sons. West Sussex, UK. 2da Edición. pp. 1-34
- Wang, G., Lu, Y., Han, J., Luo, W., Shi, Y., Wang, T., Sun, Y. 2010. Hexachlorobenzene sources, levels and human exposure in the environment of China. *Environment International*. 34: 122-130.
- Weber, T. A. 2009. Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects. *The Mycota XV*. Springer-Verlag. Berlin.
- Webster, J. y Weber, R. 2007. Basidiomycota. En: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press. Tercera Edición. Cambridge UK. pp. 487-512.

Zlatev, Z. Berova, M., Vassilev, A. 2003. Use of physiological parameters as stress indicators. *Journal of Experimental Protection And Ecology*. 4: 841-849