



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos



Centro de Investigación en Biotecnología

“Evaluación de tres hongos con potencial de biorremediación
de gasolina magna en presencia de un polvo sorbente
oleofílico”

TESIS:

Que para obtener el grado de:

Maestro en biotecnología

PRESENTA:

IBt. Laura Daniela Torres Juárez

Director de Tesis:

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Comité Tutorial

Dra. Patricia Mussali Galante – CEIB UAEM

Dra. Marcela Ayala Aceves – IBT UNAM

Dr. Ramón Batista García – CIDC UAEM

Dr. Alexandre Cardoso Taketa – CEIB UAEM

2018-2020

Índice

Resumen	7
Introducción	9
Características generales de la gasolina.....	9
Contexto nacional de la gasolina	10
Impacto ambiental por contaminación con gasolina	11
Efectos ocasionados por la contaminación por gasolina	13
Mecanismos de degradación de gasolina	14
Tratamientos físicos y químicos.....	14
Métodos biológicos.....	15
Sustratos lignocelulósicos promueven la degradación de hidrocarburos	17
Microorganismos capaces de remover gasolina	18
Hongos como potenciales removedores de gasolina	19
Enzimas relacionadas con la remoción de hidrocarburos	20
Degradación de BTX.....	21
Antecedentes	23
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
Materiales y métodos	28
Material experimental.....	28
Cinética de crecimiento en gasolina.....	29
Cinética de crecimiento con el polvo sorbente oleofílico	29
Cinética de crecimiento en gasolina con el polvo sorbente oleofílico	29
Medición de actividades enzimáticas en medios líquidos.....	30
Cuantificación de la actividad enzimática de lacasas.....	31
Cuantificación de la actividad enzimática de peroxidasas.....	32
Cuantificación del peso seco	32
Determinación de los hidrocarburos BTX por HPLC	32
Análisis estadístico.....	34
Resultados	35

Cinética de crecimiento en gasolina.....	35
Cinética de crecimiento en polvo sorbente oleofílico.....	37
Cuantificación de las actividades enzimáticas.....	39
Cuantificación de la actividad de lacasa y peroxidasa en cultivos de <i>T. atroviride</i>	39
Cuantificación del peso seco.....	40
Determinación del porcentaje de remoción por HPLC.....	41
Discusión	44
Conclusión	47
Anexos	48
Anexo. 1 Mezcla BTX.....	48
Anexo 2. Medio mínimo.....	49
Anexo 3. Análisis Estadístico.....	50
Referencias	53

Índice de figuras

Figura 1. El destino de la gasolina en el ambiente.	11
Figura 2. Vía del catabolismo de hidrocarburos aromáticos en hongos.	22
Figura 3. Cinética de crecimiento en gasolina.	36
Figura 4. Cinética de crecimiento en polvo sorbente oleofílico.....	38
Figura 5. Actividad enzimática de lacasas y peroxidases.....	40
Figura 6. Peso seco.....	40
Figura 7. Grafica de remoción de la mezcla BTX en diferentes tratamientos	43

Índice de tablas

Tabla 1. Degradación de hidrocarburos con sustratos de origen lignocelulósico como estimulantes para la biorremediación.....	17
Tabla 2. Características de la gasolina magna	28
Tabla 3. Tasas de crecimiento a diferentes concentraciones de gasolina.....	37
Tabla 4. Porcentajes de inhibición.....	37
Tabla 5. Tasas de crecimiento.	39
Tabla 6. Porcentajes de inhibición.....	39

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitirme realizar la Maestría en sus instalaciones.

Al Doctor Jorge Luis Folch Mallol, por su apoyo, liderazgo y aporte académico y humano en la realización de este proyecto.

A la Doctora María del Rayo Sánchez Carbente, por apoyarme y guiarme en los momentos que más lo requerí.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y a Rocío Rodríguez, por su apoyo incondicional y consejos durante dos años.

Al Doctor Maikel Fernández por ayudarme a realizar los análisis por HPLC.

Por supuesto a mi comité sinodal la Doctora Paty Mussali, por tener siempre disponibilidad de recibirme y hacerme observaciones de mi escrito, a la Doctora Marcela Ayala por la disponibilidad y sus comentarios siempre objetivos, al doctor Ramón Batista, por las sugerencias y apoyo, y al doctor Alexandre Taketa por sus correcciones, comentarios y disponibilidad, muchas gracias.

Resumen

La gasolina es un compuesto que, debido a su baja solubilidad en agua y alta estabilidad ocasionada por los anillos aromáticos que la componen, persiste en los ecosistemas por largos periodos de tiempo. Componentes de la gasolina son mutagénicos y carcinogénicos, por lo que la búsqueda de métodos de remoción es de gran importancia. Es por esto que, se plantea la biorremediación, como una técnica de bajo impacto ambiental y alto rendimiento para tratar sitios contaminados con hidrocarburos. Así mismo, entre los organismos que se han utilizado para remover e incluso degradar estos componentes se destacan los hongos, los cuales se han caracterizado por su diversa capacidad metabólica, morfología robusta, rápida colonización, entre otras características, además de poseer altas actividades enzimáticas oxidativas e hidrolíticas. Por otro lado, se ha reportado que algunos hongos son capaces de utilizar co-sustratos como la lignina y la celulosa logrando una biorremediación más eficaz. En el laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB se aislaron tres hongos con un alto potencial biotecnológico: un hongo ascomiceto halófilo; *Aspergillus sydowii-like* con la capacidad de crecer usando benzo(a)pireno y fenantreno como únicas fuentes de carbono, *Pycnoporus sanguineus*, aislado de una zona contaminada con petróleo al sureste de México, esta cepa demostró tener una lacasa con un alto potencial para la degradación de hidrocarburos de alto peso molecular, y *Trichoderma atroviride* que sobreexpresa una lacasa heteróloga que degrada compuestos xenobióticos.

Los tres hongos se crecieron en diferentes concentraciones de gasolina magna (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15%), los resultados demostraron que, las tasas de crecimiento en gasolina fueron mayores en comparación las tasas de crecimiento en medio de cultivo estándar (PDA), es decir, el micelio tuvo una cobertura mayor en el medio con gasolina que en el medio control; por otro lado el porcentaje de gasolina al cual ya no se detectó crecimiento fue 12.5% v/v para los tres hongos. Así mismo, el crecimiento en el sustrato ligninolítico se evaluó en dos concentraciones (1 y 2%), obteniendo los mejores resultados estadísticamente en 2% para los tres hongos, nuevamente las tasas de crecimiento fueron mayores en el sustrato ligninolítico en comparación con el control. Debido a estos resultados se decidió trabajar a una única concentración

de gasolina y sustrato ligninolítico, 10% y 2% respectivamente, con el hongo *Trichoderma atroviride*, que tuvo el crecimiento más eficiente estadísticamente en los experimentos en medio semi sólido. Consecutivamente, se realizaron los experimentos en medio líquido, utilizando una mezcla artificial de gasolina con los componentes más recalcitrantes del combustible: benceno, tolueno y xileno, para posteriormente comparar la remoción en tratamientos con y sin el sustrato lignocelulósico, mediante un análisis en HPLC, utilizando una fase móvil de metanol:agua. De igual forma del sobrenadante obtenido de los experimentos se cuantificó peso seco y actividad enzimática (lacasas y peroxidasas), donde únicamente el tratamiento que contenía al hongo y la mezcla de hidrocarburos resultó tener una remoción mayor en comparación del tratamiento que contenía el sustrato lignocelulósico, demostrando así la eficiencia de la cepa transgénica por si sola.

Introducción

Características generales de la gasolina

Los combustibles fósiles como la gasolina son la fuente de energía dominante en el planeta (Castillo-Hernández *et al.*, 2011). La gasolina es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, como los n-alcanos, iso- y ciclo- alcanos, que llegan a representar 65% de la composición total, contiene también hidrocarburos aromáticos, incluidos el benceno, tolueno y xileno, que representan el 35% de la composición restante (Méndez *et al.*, 2016). Contiene 1000 ppm de azufre, el cual proviene la obtención de gasolina a partir de la destilación fraccionada del petróleo (Li *et al.*, 2014). Su combustión genera monóxido y bióxido de carbono (Reyes *et al.*, 2018).

La gasolina se caracteriza por ser un líquido de coloración rojiza, es extremadamente inflamable, tiene una temperatura de ebullición entre 60 y 70 ° C, pH 6 y densidad de 680 kg/m³, la toxicidad aguda al ingerirse (LD₅₀ > 5000 mg/kg) puede inducir el vómito, consecutivamente el ingreso en los pulmones puede causar neumonitis química, lo que resulta mortal, además de provocar irritación cutánea (LD₅₀ > 2000 mg/Kg) que conlleva a la pérdida de la capa superficial de grasa de la piel, lo que puede conducir a padecer dermatitis; al inhalarse (LC > 5 mg/L) tiende a provocar somnolencia o vértigo, dolor de cabeza, irritación de ojos y tracto respiratorio, así como alteración del ritmo cardíaco. En cuanto a la toxicidad crónica que provoca, tiende a intensificar los efectos antes mencionados, y puede presentarse baja de presión sanguínea, pérdida parcial de la memoria y pérdida auditiva. En 1999, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) revisó la literatura mundial sobre la gasolina, y concluyó que los datos experimentales en animales proporcionan únicamente evidencia limitada de carcinogenicidad y los estudios epidemiológicos en humanos son insuficientes debido a la falta de datos complementarios que demuestren su relación con el cáncer. Sin embargo, gracias a la evidencia de estudios experimentales en animales y a la presencia de benceno y 1,3-butadieno en la gasolina, IARC concluyó que la gasolina es “posiblemente cancerígena” para los humanos, clasificada en el

apartado 2 B, es decir, en resumen, no se tiene evidencia de que presente cáncer en humanos, sin embargo, existe evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación (Wild, 2014).

Contexto nacional de la gasolina

Actualmente en México el consumo promedio de gasolina es de 125 millones de litros diarios, los cuales se dividen en los dos tipos de gasolina que existen: la magna (82%) y la premium (18%) (Solís y Pardo, 2017). Las diferencias principales entre ambas gasolinas son principalmente: el octanaje y el contenido de azufre; el octanaje se refiere a una escala que mide la capacidad antidetonante del combustible cuando se comprime dentro del cilindro de un motor, la medición está basada en el heptano y el isoctano, el heptano es el hidrocarburo que más detona por lo que se le asigna un octanaje de 0, por otro lado el isoctano, se le asigna un valor de 100, de modo que, por ejemplo, una gasolina de 95 octanos correspondería a una mezcla con el 95% de isoctano y el 5% de heptano. En resumen, a mayor octanaje, la combustión generada en el cilindro es más uniforme y controlada; mientras que, a menor octanaje, el combustible detona y explota en el motor, causando daño severo en los motores. En base a esto, la gasolina magna contiene un total de 87 octanos y la premium de 93 octanos. Por otro lado, el contenido de azufre para la gasolina magna es de 1000 ppm, mientras que la gasolina premium debido a su riguroso proceso de refinación no contiene este elemento o lo contiene en cantidades menores (<100 ppm) (Marino, 2016).

Si bien la cantidad de plomo en gasolina no supera los 100 ppm, el tetraetilo de plomo (usado como antidetonante) puede ser absorbido por inhalación y por el contacto con la piel. Después de la absorción, este compuesto orgánico de plomo es rápidamente asimilado en el hígado a metabolitos de trialquilo que son tóxicos. Los metabolitos de trialquilo, son solubles en agua y pueden bioacumularse en algunos órganos, por ejemplo en el cerebro, se metabolizan lentamente a plomo inorgánico. Finalmente, cerca del 76% del plomo en estos compuestos se excreta como plomo inorgánico en la orina, 16% en las secreciones gastrointestinales y el 8% en las estructuras epiteliales y el sudor (Zuleta *et al.*, 2013).

Impacto ambiental por contaminación con gasolina

Dentro de las emergencias ambientales reportadas para el año 2015 en México, el 85.2% fueron provocadas por derrames de hidrocarburos y sustancias tóxicas, la gasolina se encuentra como el segundo contaminante que más genera emergencias ambientales. Para el 2016 se tiene conocimiento de que, tan solo en Querétaro existieron 58 lugares contaminados por el combustible (Curiel, 2019).

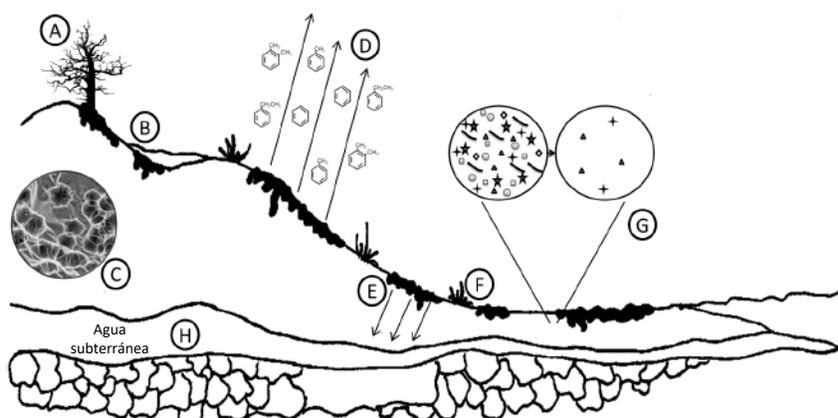


Figura 1. El destino de la gasolina y cambios en las características de un sitio después de un evento de derrame: (A) muerte de la vegetación, (B) filtración del combustible, (C) estructura alterada del suelo, (D) volatilización, (E) percolación de hidrocarburos, (F) zonas aeróbicas, (G) disminución inicial de poblaciones microbianas y diversidad, (H) aguas subterráneas contaminadas con hidrocarburos. Esquema modificado de Truskewycz et al., 2019.

Cuando el hidrocarburo entra en el suelo (figura 1), su destino depende de factores climatológicos, propiedades del contaminante y del suelo. El suelo tiene la capacidad de retener el hidrocarburo debido a que el contaminante dispone de una mayor superficie para adherirse (Truskewycz *et al.*, 2019).

Debido a esto, en una investigación (Curiel, 2019) se estudió la modificación de los asentamientos que presentaba el suelo debido a su contaminación con gasolina magna, el suelo analizado tenía propiedades de arcilla de alta compresibilidad que, en su estado seco fue expuesta a la gasolina y se monitoreó su efecto a los siete días de exposición y a los nueve meses para analizar la modificación en sus propiedades geotécnicas y la consolidación. En los resultados se observó una disminución en la gravedad específica atribuida al recubrimiento de las partículas del suelo por la gasolina, en la granulometría y en los límites de consistencia no se

observaron cambios significativos, el suelo contaminado se clasificó como arcilla de alta compresibilidad (CH) de la misma forma que el suelo natural, sin embargo el porcentaje de arcilla provocó un aumento en la actividad de las arcillas de 0.75 a 0.78, la superficie específica del suelo disminuyó de 691.51 a 514.06 m² / g, por lo que se concluye que el suelo contaminado presentó mayor deformación en un periodo más largo (Chikere *et al.*, 2011).

Las descargas accidentales en los puntos de transferencia del combustible, así como instalaciones de almacenamiento inadecuadas, pueden presentar un riesgo de contaminación significativo para el ambiente. Debido a su alto contenido de componentes volátiles, se evapora una vez que es liberada al medio, y así, puede penetrar y contaminar el suelo y aguas subterráneas. Contiene componentes con potencial de bioacumularse (Tang *et al.*, 2012).

El objetivo de distintos trabajos científicos ha sido determinar los efectos de la contaminación por gasolina en las propiedades microbianas del suelo y la influencia de las características del suelo en estos efectos. Para ello, Labud *et al.*, 2007 también realizaron bioensayos de toxicidad y parámetros microbiológicos y bioquímicos en dos tipos de suelos (uno arenoso y otro arcilloso) contaminados a una tasa de carga del 5% y 10% de gasolina. Los suelos se mantuvieron bajo condiciones controladas, (50-70% de capacidad de retención de agua y a temperatura ambiente) durante seis meses y se monitorearon varios parámetros microbiológicos y parámetros de toxicidad a 1, 60, 120 y 180 días después de la contaminación. Los efectos tóxicos de la contaminación por hidrocarburos fueron mayores en el suelo arenoso. Los hidrocarburos de la gasolina inhibieron la biomasa microbiana, el mayor efecto negativo se observa en el suelo arenoso contaminado con gasolina. En ambos suelos, la contaminación por gasolina disminuyó la respiración microbiana. En general, la gasolina tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre las actividades de hidrolasas involucradas en los ciclos de N, P y C en ambos suelos. Así mismo, en ambos suelos, se observó un efecto fitotóxico en la germinación de semillas de cebada y centeno en los suelos contaminados (Labud *et al.*, 2007).

Algunos estudios han demostrado que la contaminación por hidrocarburos inhibe las actividades enzimáticas de los microorganismos en muestras de suelo. Como lo demostró Alrumman *et al*, en 2015, donde observaron que el grado de inhibición aumentaba significativamente con los niveles crecientes de hidrocarburos, y varió con el período de incubación. El suelo que analizaron tenía valores altos de biomasa microbiana y un alto número de bacterias heterotróficas, sin embargo, tenía las actividades bajas de deshidrogenasa y de fosfatasa. Los resultados también mostraron que los suelos tenían cantidades similares de bacterias degradadoras de hidrocarburos en algunos tratamientos del suelo, mientras que otros tratamientos con mayor humedad tuvieron un mayor número de hongos degradadores de hidrocarburos. Demostrando que, los hidrocarburos en suelo proporcionan una fuente de carbono opcional para el crecimiento microbiano (Alrumman *et al*, 2015).

Efectos ocasionados por la contaminación por gasolina

Los derrames de gasolina son tóxicos, particularmente para flora y fauna acuática. Las películas formadas sobre el agua pueden afectar la transferencia de oxígeno y por lo tanto a los organismos que viven ahí. La mezcla es altamente tóxica debido a la presencia de hidrocarburos aromáticos, como el benceno, tolueno y xilenos (Tang *et al.*, 2012).

A través de los años se ha investigado la toxicidad de la gasolina en los distintos ecosistemas, por ejemplo, se analizaron los efectos nocivos de la gasolina en larvas de pejerrey marino *Odontesthes argentinensis*, mediante pruebas de toxicidad y exámenes histopatológicos, encontrando que, la concentración letal media después de 96 h de exposición (CL₅₀) fue igual a 5.48%, sin embargo, el examen histológico de las larvas expuestas a gasolina después de 96 h reveló lesiones en: las branquias, pseudo branquias y esófago, mismos que presentaron hiperplasia epitelial, por otro lado el hígado presentó dilatación de los sinusoides hepáticos, degeneración nuclear y binucleada de los hepatocitos. La toxicidad aguda de la gasolina resultó ser al menos cinco veces mayor a la del petróleo. Los resultados resaltan los efectos tóxicos de los hidrocarburos aromáticos en este ambiente (Mastandrea *et al.*, 2010).

Aunque la gasolina es un contaminante importante de los ecosistemas acuáticos, hace falta información sobre los posibles efectos de este derivado del petróleo en el ADN de la biota acuática. Un estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos genotóxicos y mutagénicos de la gasolina diluida en agua al 5%, durante exposiciones agudas (6, 24 y 96 h) en la almeja asiática *Corbicula fluminea*. Se utilizó el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos (MN) para analizar hemocitos y células branquiales de *C. fluminea*. Para las tres exposiciones, el ensayo cometa detectó daño en el ADN en hemocitos y células branquiales del molusco. La prueba de MN detectó un daño significativo en el material genético de los hemocitos tan solo después de 96 h de exposición. En general, los hallazgos indican que esta mezcla de hidrocarburos tiene efectos genotóxicos y mutagénicos en *C. fluminea* (Fedato *et al*, 2010).

Mecanismos de degradación de gasolina

Los hidrocarburos de la gasolina, ya en el medio ambiente sufren descomposición, lo que debe a influencias físicas (dispersión), fisicoquímicas (evaporación, disolución, sorción), químicas (fotooxidación, autooxidación) y biológicas (catabolismo de hidrocarburos mediante plantas y microorganismos) (Zhang *et al.*, 2010).

Tratamientos físicos y químicos

Entre los métodos más usados para la remoción de gasolina se encuentran la incineración y la dispersión (Gómez *et al.*, 2009). Estos métodos son costosos y muchas veces sólo parcialmente eficientes. En la mayoría de los casos no proveen una solución completa ya que pueden dar lugar a otros compuestos tóxicos que se acumulan en el ambiente y que todavía pueden afectar a otros organismos (Karpouzas & Singh 2006).

El “Plan Nacional de Contingencia para Derrames de Hidrocarburos y Sustancias Nocivas Potencialmente Peligrosas”, que tiene como objetivo; la contención, recuperación y confinamiento del hidrocarburo, a través de actividades como la dispersión mecánica (chorros de agua) y dispersión química, además de proponer

la quema como respuesta alternativa. El plan establece bases y líneas de acción y coordinación general ante un incidente que resulte en contaminación ambiental, a fin de contrarrestar el daño a la vida humana y fauna, aves, zonas pesqueras, áreas ecológicamente sensibles y playas (Curiel, 2019).

En situaciones de derrames en ríos y lagos ya se utiliza un “Kit de Derrames”, que está compuesto por mantas absorbentes de hidrocarburos, palas especiales y tambos de recuperación en los que se almacena el hidrocarburo y se dispone en un depósito, el cual es dispuesto bajo la legislación ambiental local vigente, relacionada con la disposición de residuos para su adecuada eliminación, que a su vez puede concluir con una incineración controlada (Pérez-Muñoz *et al.*, 2019).

Métodos biológicos

También se han utilizado absorbentes como medida para separar el combustible de derrames en agua. Existen dos tipos: minerales y orgánicos, los minerales se basan principalmente en la arcilla, como las sepiolitas que se caracterizan por ser abrasivos al tener cristales de sílice en su composición, por lo que tienen una menor capacidad de absorción; por otro lado los absorbentes orgánicos, como la turba y el lirio acuático *Eichornia crassipes*, el cual es deshidratado y triturado para este fin, tiene un gran capacidad de absorción y brinda beneficios significativos en el cuidado del medio ambiente, gracias a su origen natural, que no limitan su capacidad de absorber y encapsular a derivados del petróleo, además de que también funciona con solventes, metales pesados, pesticidas y herbicidas (Li *et al.*, 2016).

El lirio acuático o jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) ya es utilizado para la elaboración de un polvo absorbente oleofílico, que absorbe derrames o fugas de hidrocarburos, aceites y otras sustancias industriales, tanto en superficies sólidas como el cemento o asfalto, así como en superficies acuosas como ríos y cuerpos de agua. Este producto tiene la capacidad de absorber hasta 25 veces su propio peso. Al momento de aplicarlo sobre una superficie sólida o acuosa, éste se integra con el hidrocarburo hasta formar un conglomerado, que permite manipularlo de manera sencilla. El lirio es una plaga e interrumpe con las actividades productivas en el sector primario en los ríos de México, sin embargo, su eliminación a través de

productos químicos como el glifosato provocan la descomposición de materia orgánica y la reincorporación de contaminantes, generando otro problema ambiental, por lo que la utilización de este polvo sorbente hecho a base del lirio acuático resulta ser una alternativa potencial para la recuperación de contaminantes (Carrión, 2012).

Lu *et al.*, en 2004 investigaron la capacidad de *E. crassipes* para la acumulación de oligoelementos como Ag, Pb, Cd y Zn, que mostró una bioacumulación en rango de 5 a 60 mg/L de estos elementos. En este estudio se encontró que los iones penetraban en las plantas mediante un proceso pasivo, principalmente mediante el intercambio de cationes que ocurrían en la pared celular. Lu y colaboradores concluyeron que, el jacinto de agua se puede utilizar en “Ecotecnología” (tecnología ambiental) para construir humedales, que ayudan a prevenir la propagación de la contaminación por metales pesados en ambientes acuáticos. Asimismo, ya se han reportado altas tasas de remoción de metales pesados, cerca del 100% tanto en humedales naturales como artificiales (Bartha, 2017).

La eficiencia del jacinto de agua en la degradación de sustancias orgánicas también ha sido investigada por Saurabh y Abhijit en 2017, quienes reportaron que es capaz de acumular altos niveles de hidrocarburos policíclicos aromáticos constituidos de más de tres anillos, su aplicación redujo aproximadamente el 45% del naftaleno en agua residual en 7 días. En este estudio se destaca el potencial del lirio de adsorber compuestos fenólicos y metales pesados simultáneamente. Los hallazgos recientes han sugerido que la adsorción de hidrocarburos por *E. crassipes* está dominada por las fuerzas de Van Der Waals (Bhainsa, 2006). Por lo tanto, la planta tiene la capacidad de adsorber otros compuestos como los inorgánicos y pesticidas (Evangelou y Schaeffer, 2007).

Sustratos lignocelulósicos promueven la degradación de hidrocarburos

La adición de material de origen lignocelulósico se ha estudiado ampliamente en los últimos años, debido a que impulsa la producción de una gran variedad de enzimas que son capaces de degradar distintos xenobióticos (Pinos *et al.*, 2018).

Los componentes principales de los materiales lignocelulósicos son: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Malherbe y Cloete, 2002). La celulosa es un polímero lineal de glucosa unida a través de enlaces β -1,4, que es muy difícil de disolver en agua o hidrolizar en condiciones naturales. La hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto de diferentes hexosas, pentosas y ácido glucorónico, es más soluble que la celulosa. La lignina es un polímero altamente irregular e insoluble que consiste en subunidades de fenilpropanoides. La lignocelulosa es un sustrato complejo y su degradación no depende solo de las condiciones ambientales, sino también de la capacidad de degradación de la población microbiana (Carrera *et al.* 2001).

Estudios recientes describen que, sustratos de origen lignocelulósico son potencialmente útiles como estimulantes para la biorremediación (Tabla 1). En 2008 se reportó que un suelo contaminado con petróleo con más de 38,000 mg/kg de hidrocarburos totales de petróleo (TPH), fue tratado con composta de astillas de madera (Atagana, 2008), y en dos meses, el 68.8% de TPH fue removido en el tratamiento con la composta en comparación con el 10% en el tratamiento control.

Sustrato lignocelulósico	Tipo de contaminantes	Porcentaje total removido	Referencias
Astillas de madera y retos de hojas	Hidrocarburos del petróleo crudo	100%	Atagana, 2008
Desecho de aves de corral	Hidrocarburos extraídos de sedimentos marinos	97.13%	Chikere <i>et al.</i> , 2012
Estiércol de vaca	Hidrocarburos provenientes de un manglar contaminado	62.96%	Orii <i>et al.</i> , 2012
Hojas de té, soja y cáscara de papa	Diesel	53.5%	Dadrasnia y Agamuthu, 2013
Bagazo de caña de azúcar	Hidrocarburos del petróleo crudo	100%	Hamzah <i>et al.</i> , 2014

Tabla 1. Degradación de hidrocarburos con sustratos de origen lignocelulósico como estimulantes para la biorremediación

Las investigaciones más recientes han tratado de combinar ambos mecanismos (degradación de material lignocelulósico con microorganismos) para lograr mayores tasas de degradación (Arroyo y Rogel, 2010). La remoción de los hidrocarburos en los tratamientos con material lignocelulósico se atribuyó a la presencia de nutrientes en dichos materiales. Algunos grupos de investigación (Riojas *et al.*, 2010) han sugerido que los nutrientes orgánicos, en particular el nitrógeno y el fósforo, optimizan la capacidad degradativa natural de los microorganismos.

La mayoría de los hongos son capaces de degradar la celulosa. Sin embargo, su capacidad para la degradación de la lignocelulosa tuvo un gran impacto en la comunidad científica, ya que los hongos de podredumbre blanca producen enzimas muy potentes degradantes de lignina (Rouches *et al.*, 2016).

Las características estructurales de este hetero polímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación. Siendo una molécula de lignina con un peso molecular de entre 600-1000 kDa, es evidente que su tamaño le impide poder ser degradada intracelularmente. Además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta tampoco puede ser degradada por mecanismos típicos de hidrólisis. Por lo que, cualquier grupo de enzimas capaces de atacar la lignina, deben ser además de extracelulares, bastante inespecíficas (Bilal *et al.*, 2017).

Microorganismos capaces de remover gasolina

El uso de microorganismos y/o sus productos para reducir, eliminar, contener o transformar los contaminantes presentes en suelos, sedimentos y agua, es parte del proceso de biorremediación (Corona e Iturbe, 2005). Este proceso involucra mineralización, transformación y/o alteración de dichos contaminantes. La presencia de microorganismos con las capacidades metabólicas apropiadas es un requisito importante para la biorremediación de hidrocarburos (Das y Chandran, 2011). Se ha considerado a la biorremediación como uno de los métodos más apropiados para la restauración de sitios contaminados. Así, muchas de las propuestas para la recuperación de sitios contaminados especifican la biorremediación como la alternativa más viable (Randy *et al.*, 1999).

Los enfoques para la implementación de la biorremediación dependen del lugar donde se encuentre el sitio contaminado, es decir, si el suelo a tratar está inmóvil en el medio ambiente o, si se va a excavar para su tratamiento en una instalación externa. Si está en el sitio, el término será remediación *in situ* y si se debe trasladar, se describe como *ex situ*, que involucra la excavación y remoción del suelo contaminado, lo cual es un procedimiento relativamente más costoso (Ledesma *et al.*, 1994).

Hongos como potenciales removedores de gasolina

Los tratamientos de biorremediación que emplean hongos ofrecen la ventaja de ampliar la variedad de sustratos que pueden ser removidos, mediante las características únicas que poseen y su capacidad de proliferar en ambientes poco favorables para las bacterias. Los tratamientos de biorremediación fúngica pueden ser particularmente apropiados para la remediación *in situ* de suelos, donde los compuestos recalcitrantes (por ejemplo, hidrocarburos policíclicos aromáticos) y la biodisponibilidad son difíciles de controlar (Buttress *et al.*, 2016).

Los hongos lignocelulósicos han desarrollado un sistema enzimático no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este sistema permite que las enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La amplia variedad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere uso potencial en biorremediación (Méndez-Matías *et al.*, 2018).

Los hongos de podredumbre blanca, juegan un papel importante en la degradación de madera y materiales orgánicos, lo que se debe principalmente a procesos relativamente inespecíficos utilizados para la degradación de la lignina (Mishra, 2017). Esta degradación se lleva a cabo mediante enzimas como: peroxidasas y lacasas (Kinnunen *et al.*, 2017). La reactividad de estas enzimas no específicas ha llevado a la aplicación de estos organismos, para la degradación de una gama de compuestos orgánicos. Grupos de investigación han estudiado ampliamente el metabolismo fúngico de los hidrocarburos de bajo peso molecular. La mayoría de los mecanismos degradativos son co-metabólicos, es decir, en donde se utiliza una

fuerza de carbono alternativa para la energía y el crecimiento, mientras que el hidrocarburo se transforma como consecuencia del crecimiento del organismo (Francesc *et al.*, 2019).

Estos hongos lignocelulósicos comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para mineralizar eficientemente la lignina. Probablemente, esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía (Vélez *et al.*, 2020). La mayoría de los hongos lignocelulósicos pertenecen al grupo de los basidiomicetos y son los microorganismos más eficientes en degradar totalmente la lignina. Estos organismos secretan enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su mineralización (Vélez *et al.*, 2020).

Enzimas relacionadas con la remoción de hidrocarburos

A partir de los estudios realizados con hongos lignocelulósicos en los años setenta, se ha comprobado que la degradación de la lignina da lugar a productos que provienen de la ruptura de anillos aromáticos. Por esto, se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina (Kirk y Chang, 2009). Consecutivamente, tres grupos reportaron de manera independiente, el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo (Higuchi, 1993), y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). A esta enzima se le conoce ahora como lignino peroxidasa (LiP). Después se descubrieron también una peroxidasa dependiente de Manganeso (manganeso-peroxidasa) y otra enzima llamada versátil-peroxidasa, ya que posee tanto la actividad dependiente de manganeso como la actividad de lignino peroxidasa (Ellouse y Sayadi, 2016)

Además de estas peroxidasas encontradas en hongos lignocelulósicos se detectó la producción de otra enzima, una fenol-oxidasa denominada lacasa. Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos

redox, además puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina (Dávila-Vázquez, 2006). Estas enzimas ligninolíticas (lacasas y peroxidasas) pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más. Además de estos sistemas enzimáticos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de la lignina (Seyma y Raziye, 2017).

Degradación de BTX

Los microorganismos que utilizan estos compuestos aromáticos como fuente de carbono, emplean unas rutas bioquímicas llamadas vías altas o periféricas que se basan en modificar los diferentes anillos aromáticos en protocatechuate y catechol. Es decir, la gran variedad de compuestos aromáticos que se pueden encontrar son convertidos a esas dos moléculas. A partir de estas dos moléculas en las que convergen todos los compuestos, ya se puede llevar a cabo el rompimiento del anillo mediante enzimas específicas. Esta segunda fase en la degradación se lleva a cabo en las vías bajas (Cruz-Narváez *et al.*, 2019).

Experimentos con enzimas purificadas demostraron que las enzimas ligninolíticas pueden degradar los hidrocarburos aromáticos (figura 2). Se ha observado que las enzimas ligninolíticas realizan una oxidación de radicales de un electrón, produciendo radicales catiónicos a partir de contaminantes seguidos de la aparición de quinonas. Un estudio (Ortega-Clemente *et al.*, 2009) determinó la degradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos por trece cepas fúngicas lignocelulósicas, y descubrió que el grado de degradación varía según qué enzimas ligninolíticas se usen. La degradación máxima de naftaleno (69%) se observó por la cepa 984 que tenía actividad peroxidasa, seguida por la cepa 870 (17%) que mostró actividades de peroxidasa y lacasa (Dávila-Vázquez, 2006).

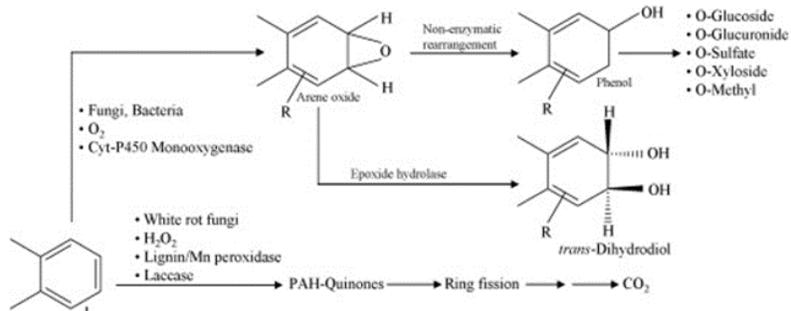


Figura 2. Vía del catabolismo de hidrocarburos aromáticos en hongos.
Imagen modificada de Haritash y Kaushik, 2009.

La degradación microbiana por hongos lignocelulósicos se ha estudiado intensamente durante los últimos años y debido a la estructura irregular de la lignina, estos hongos producen enzimas extracelulares con muy baja especificidad que sirven para la degradación de otros compuestos xenobióticos (Haritash y Kaushik, 2009).

Antecedentes

El laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM, cuenta con una colección de hongos que tiene un alto potencial biotecnológico para la biorremediación de sitios contaminados con gasolina;

Aspergillus sydowii-like es una cepa fúngica halófila y termotolerante, aislada a partir de una fermentación de bagazo de caña de azúcar en presencia de 2M NaCl. Cuando se cultivó en diferentes sustratos lignocelulósicos tales como: paja de trigo, rastrojo de maíz, fibras de agave, bagazo de caña de azúcar y aserrín produce celulasas, xilanasas, manganeso peroxidasa (MnP) y esterases. Los resultados obtenidos de este estudio respaldan el potencial de *A. sydowii like* para degradar los materiales lignocelulósicos y su posible aplicación biotecnológica, especialmente en sitios que tengan alta salinidad (Batista-García *et al*, 2014). En el laboratorio ya se ha demostrado que esta cepa es capaz de degradar a los HPAs fenantreno y benzo(a)pireno, en condiciones de alta salinidad (1.5M de NaCl).

Además, Dantán-González *et al.* (2008) caracterizaron la actividad lacasa de una cepa de *Pycnoporus sanguineus*, que pertenece al filo de hongos filamentosos Basidiomycota, los que han sido ampliamente estudiados por su capacidad para degradar lignina, un componente principal de la madera y uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Consiste en un polímero heterogéneo y altamente reticulado con similitud estructural con varios contaminantes recalcitrantes, como hidrocarburos aromáticos policíclicos. Este tipo de hongos son capaces de mineralizar la lignina secretando enzimas oxidativas, como las peroxidases y las lacasas, que tienen una amplia gama de sustratos. Las lacasas son oxidasas que se encuentran en diferentes grupos de organismos (bacterias, hongos, plantas e insectos), aunque las lacasas fúngicas son las mejor estudiadas. Estas son enzimas glicoproteicas con masas moleculares de 50-103 kDa y que requieren oxígeno para oxidar fenoles. Esta cepa de *Pycnoporus sanguineus*, fue aislada de un sitio contaminado con petróleo en un área tropical ubicada en Veracruz, México. *P. sanguineus* es una cepa termo y halotolerante, fue capaz de crecer a 47 °C y en un

medio de cultivo que contiene NaCl 500 mM, tolera la presencia de 30,000 ppm de aceite maya crudo. En este estudio encontraron que esta cepa tiene una enzima lacasa que, inusualmente tiene dos isoformas activas, así mismo, mostró alta termo estabilidad, conservando el 40% de su actividad original después de 3 horas a 60°C (Dantán-González, *et al.*, 2008). Los basidiomicetos son de interés porque pueden degradar los compuestos xenobióticos y, por lo tanto, pueden ser aplicables en la biorremediación de ambientes contaminados.

Otro grupo atractivo de hongos capaces de hacer biorremediación son algunas especies de *Trichoderma*, ya que han sido consideradas como buenos sistemas para la expresión heteróloga de proteínas debido a que pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales eucariotas y mostrar buenas capacidades de secreción. Son productores eficientes de enzimas extracelulares que degradan una gran variedad de sustratos (Cázares-García *et al.*, 2014). En un trabajo elaborado por Balcázar-López *et al.* (2016) evaluaron el potencial de una cepa transgénica la cual expresa la lacasa heteróloga de *P. sanguineus* para la transformación y eliminación de compuestos xenobióticos. La cepa modificada sobreexpresa una lacasa que degrada compuestos tóxicos mucho mejor que la cepa silvestre y elimina más eficientemente compuestos fenólicos presentes en aguas residuales, industriales, así como bisfenol A (un disruptor endocrino) del medio de cultivo. Además, la lacasa heteróloga expresada fue capaz de decolorar diferentes tintes, así como eliminar el benzo (a) pireno y el fenantreno *in vitro*, mostrando su potencial para la degradación xenobióticos.

Por otro lado, un método de remediación que se ha usado con éxito es la adición de un polvo sorbente oleofílico hecho a base de lirio acuático, ya que éste absorbe el contaminante y puede minimizar el impacto medioambiental. La aplicación de absorbentes y/o surfactantes en zonas de contaminación, es una de las técnicas más empleadas para inmovilizar el contaminante (Cruz-Guzmán, 2007). La introducción de absorbentes de origen natural genera un impacto mínimo en el ecosistema tratado, el polvo sorbente actúa como una “esponja” reteniendo los contaminantes por absorción, separándolos del agua o del suelo contaminados,

posteriormente el complejo polvo-contaminante podría servir como complemento para el crecimiento (polvo) y degradación (contaminante) mediado por hongos.

Justificación

En los últimos años, la contaminación causada por gasolina ha ido en aumento, debido a malas prácticas de almacenamiento y/o distribución, afectando al medio ambiente y la salud humana. Es por ello que se requieren de alternativas biotecnológicas para remediar este problema. La biorremediación se plantea como una estrategia de recuperación de ecosistemas, que utiliza microorganismos con alto potencial de degradación de los xenobióticos; para este fin, los hongos han demostrado ser excelentes colonizadores de ecosistemas gracias a su crecimiento micelial, y se han destacado también por su capacidad para la producción de enzimas oxidativas inespecíficas que degradan compuestos de gran complejidad como la lignina, y a su vez otros compuestos de estructura similar. Se ha reportado que algunos hongos son capaces de incrementar su potencial de bioremediación al co-metabolizar sustratos como la lignina (proveniente del polvo sorbente oleofílico) y la celulosa durante la biorremediación de sitios contaminados.

Hipótesis

La adición del polvo sorbente oleofílico mejorará la capacidad de remoción de gasolina artificial tipo magna por los hongos *Aspergillus sydowii-like*, *Pycnoporus sanguineus* CeIBMD001 y *Trichoderma atroviride* Talcc3.

Objetivo general

Evaluar la eficiencia de remoción de una gasolina artificial tipo magna por *Aspergillus sydowii-like*, *Pycnoporus sanguineus* CeIBMD001 y *Trichoderma atroviride* Talcc3 en presencia de un polvo sorbente oleofílico.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración de gasolina magna tolerada por *A. sydowii-like*, *P. sanguineus* CeIBMD001 y *T. atroviride* Talcc3.
- Evaluar el crecimiento de *A. sydowii-like*, *P. sanguineus* CeIBMD001 y *T. atroviride* Talcc3 sobre el polvo sorbente oleofílico.
- Evaluar la tasa de remoción de una gasolina artificial con en el polvo sorbente oleofílico por los hongos: *A. sydowii-like*, *P. sanguineus* CeIBMD001 y *T. atroviride* Talcc3.

Materiales y métodos

Material experimental

Polvo sorbente oleofílico

Para los estudios de remoción de gasolina magna se utilizó el polvo sorbente oleofílico obtenido de lirio acuático seco y triturado, el cual se mantuvo en condiciones estériles para todos los tratamientos.

Gasolina magna

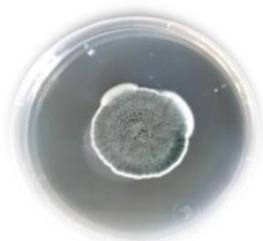
Las características de la gasolina magna utilizada en este trabajo se muestran en la tabla 2.

Descripción de gasolina magna	
Apariencia, olor y estado físico:	Líquido a temperatura ambiente, olor característico, incoloro / amarillo.
Punto de ebullición:	25 °C
Punto de fusión:	-70 °C
- pH:	6
- Solubilidad:	Insoluble en agua. Soluble en alcohol, éter, cloroformo, benceno.

Tabla 2. Características de la gasolina magna

Cepas

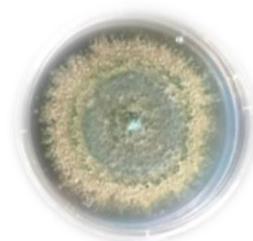
Las cepas *A. sydowii-like* y *P. sanguineus* crecieron en medio agar-papa-dextrosa (PDA por sus siglas en inglés), mientras que *T. atroviride* Talcc3 creció en medio agar-papa-dextrosa adicionando de higromicina (50µg/ml) como marcador de selección que mantenga la lacasa.



Aspergillus sydowii-like



Pycnoporus sanguineus



Trichoderma atroviride

Cinética de crecimiento en gasolina

Para la evaluación de la cinética de crecimiento, se empleó agar dextrosa papa con gasolina magna a concentraciones: 1, 2.5, 5, 7.5 y 10%. Cada concentración se realizó por triplicado para cada cepa. En cajas Petri se vaciaron 20 ml de medio semi sólido, y se adicionó el volumen correspondiente a cada concentración de gasolina, se dejó solidificar y se colocó un disco de agar de 7 mm. Se dejaron crecer a 28 °C, sin agitación durante 20 días. El crecimiento se midió a través del diámetro cada 48 h con una regla, en 4 puntos diferentes de la caja.

De las mediciones obtenidas se calculó la tasa de crecimiento, a partir de la ecuación de la recta: $y=mx+b$, y el porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula: $(\text{Crecimiento en cm del medio con gasolina}) / (\text{Crecimiento en cm del medio control}) \times 100$.

Cinética de crecimiento con el polvo sorbente oleofílico

Para la evaluación de esta cinética, se empleó agar dextrosa papa con polvo sorbente oleofílico al 1 y 2 %. Para cada concentración se realizó por triplicado en cada cepa. En cajas Petri se vaciaron 20 ml de medio semi sólido, y se adicionó el volumen correspondiente a cada concentración de polvo sorbente, se dejó solidificar y se colocó un disco de agar de 7 mm en el centro. Se dejaron crecer a 28 °C, sin agitación durante 20 días. Posteriormente la biomasa fue medida del diámetro cada 48 hrs con una regla, en 4 puntos diferentes de la caja.

De las mediciones obtenidas se calculó la tasa de crecimiento, a partir de la ecuación de la recta: $y=mx+b$, y el porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula: $(\text{Crecimiento en cm del medio con gasolina}) / (\text{Crecimiento en cm del medio control}) \times 100$.

Cinética de crecimiento en gasolina con el polvo sorbente oleofílico

Los medios de cultivo sólidos suplementados con la gasolina y polvo sorbente se prepararon de igual manera como las cinéticas anteriores, pero considerando únicamente las concentraciones 5, 7.5 y 10% para la gasolina, y las concentraciones

1 y 2% para el polvo sorbente oleofílico, de manera que para cada cepa se realizara por triplicado.

De las mediciones obtenidas también se calculó la tasa de crecimiento, a partir de la ecuación de la recta: $y=mx+b$. Y también se calculó el porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula: $(\text{Crecimiento en cm del medio con gasolina}) / (\text{Crecimiento en cm del medio control}) \times 100$

Medición de actividades enzimáticas en medios líquidos

Se preparó previamente un pre inóculo, se inocularon los hongos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de PDA y cinco discos de agar para el caso de *Trichoderma atroviride*, que se creció durante 7 días a 28 °C con una agitación de 120 rpm. Posteriormente la biomasa fue licuada para homogenizar el pre inóculo, posteriormente se tomó 1 ml del pre inóculo para inocular los matraces para el posterior ensayo.

Para estos experimentos se realizó la mezcla de una gasolina sintética al 10% (Anexo 1) elaborada a base de tres de sus componentes más tóxicos: benceno, tolueno y xileno (BTX) y se creció al hongo en medio mínimo líquido (Anexo 2).

Se montaron cinco tratamientos:

- A) Medio mínimo + mezcla BTX + polvo sorbente oleofílico + hongo.
- B) Medio mínimo + mezcla BTX + hongo.
- C) Medio mínimo + mezcla BTX+ polvo sorbente oleofílico
- D) Medio mínimo + mezcla BTX.
- E) Medio mínimo + hongo + polvo sorbente oleofílico.

Los cultivos se incubaron durante 12 días a 28 °C y a 150 rpm de agitación.

La medición de las actividades enzimáticas se realizó en microplacas de 96 pozos, se tomaron muestras de 4 ml, se centrifugaron a 4000 rpm y al sobrenadante se le determino la actividad utilizando un espectrofotómetro automatizado modelo Epoch (BioTek). La colecta de muestras se llevó a cabo como sigue:

1. Para los tratamientos A, B y E (que contenían la cepa), se colectaron 4 ml del sobrenadante, cada tres días y hasta alcanzar el día 12. Para los tratamientos C y D (que no contenían la cepa), se realizó la medición de tres puntos específicos: inicio, intermedio y final.
 - a. Para los tratamientos que contenían el polvo sorbente y/o el hongo se realizó una filtración al vacío, para separar la materia orgánica del sobrenadante, la materia orgánica se almacenó para posteriormente medir el peso seco.
2. Se colectaron 4 ml de sobrenadante por muestra y se centrifugó en tubos de 15 ml a una velocidad de 4000 rpm durante 15 minutos.
3. Se evaluaron las actividades enzimáticas de lacasa y peroxidasa utilizando 2 ml del sobrenadante recuperado.

Cuantificación de la actividad enzimática de lacasas

La determinación de la actividad de lacasa se monitoreo por la reacción del ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico (ABTS por sus siglas en inglés) en buffer de acetatos 2M (pH 4.5). En presencia de enzimas oxidativas como las lacasas, el ABTS se oxida dando una coloración azul. El coeficiente de extinción molar para el ABTS es de 36,000 M⁻¹ cm⁻¹. La Δ Abs se determinó a 420 nm.

La reacción se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos, en las cuales se colocaron:

- 200 μ l del sobrenadante.
- 90 μ l de Buffer de citratos (Anexo 6).
- 10 μ l de ABTS a 30 mM (Anexo 7).

La lectura se inició al momento de poner el sustrato, justo cuando comienza la reacción, tomando lecturas cada minuto durante 15 minutos.

En este estudio los resultados se muestra la actividad volumétrica, que se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de ABTS/mL/min, expresada en U/L.

Cuantificación de la actividad enzimática de peroxidasas

La determinación de actividad de peroxidasas se realizó con el mismo protocolo que para las lacasas, con la diferencia de añadir 0.005% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La medición se realizó a ΔAbs de 414 nm, por la formación del radical del ABTS (coeficiente de extinción molar de 36 000 $M^{-1} cm^{-1}$).

Las mediciones tanto para lacasas como para peroxidasas se expresaron como actividad volumétrica (U/ml), la cual se define como: la cantidad de enzima que produce 1 μmol de producto por unidad de tiempo (t), en 1 ml.

La reacción se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos, cada pozo contenía:

- 200 μl de sobrenadante.
- 80 μl de Buffer de citratos (Anexo 6).
- 10 μl de ABTS a 30 mM (Anexo 7).
- 10 μl de H_2O_2 al 0,005% (Anexo 8.)

La lectura se inició al momento de poner el sustrato, tomando lecturas cada minuto durante 15 minutos.

Cuantificación del peso seco

La materia orgánica almacenada previamente en la filtración de los tratamientos fue colocada en charolas de aluminio, y dispuesta dentro de un horno durante 72 horas. Al finalizar el periodo, se realizó el pesado en una balanza analítica. La pérdida de peso se calculó como gramos de peso seco por día.

Determinación de los hidrocarburos BTX por HPLC

Para determinar la remoción de los hidrocarburos benceno, tolueno y xilenos, se tomaron como 100% las mediciones del día 0. El procedimiento de la muestra que se inyecta al HPLC se llevó a cabo como sigue: se realizó una extracción líquido: líquido de la muestra con hexano (Hexano 70:30 medio de cultivo), se recolectó el hexano a través de una bureta, y se obtuvo una separación de dos fases, de las cuales se tomó únicamente la fase formada en la parte superior, es decir la fase orgánica, este paso se llevó a cabo dos veces por muestra para extraer la mayor

cantidad del hidrocarburo. Posteriormente, el hexano colectado se deja evaporar en un rota-evaporador para posteriormente agregar 1 ml de la fase móvil (Metanol-agua) que utilizará la columna. La separación se realizó usando una columna C-18 (0,25 mm de diámetro por 30 m de longitud, 0,25 μm de espesor de película) utilizando una fase móvil Metanol:H₂O (70:30) con un bombeo de 0,8 ml/minuto, con temperatura de 30 °C (Zhu *et al.*, 2016).

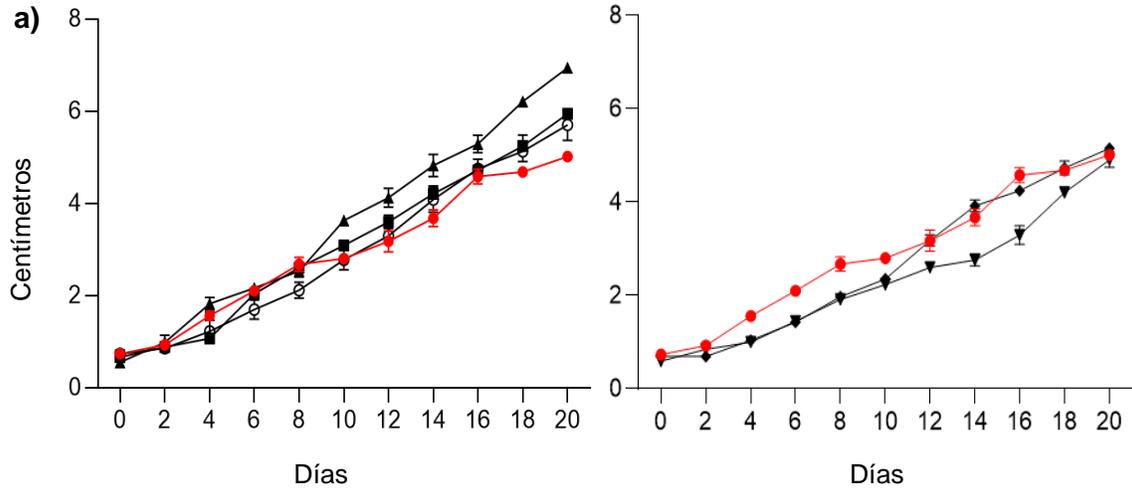
Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados se sometieron primeramente a la prueba de ANOVA de dos vías en el programa GRAPHPad para determinar la fuente de variación utilizando un $\alpha=0.05\%$, posteriormente se realizó una comparación múltiple de medias para verificar si había diferencias significativas entre el control y los tratamientos, utilizando la prueba de Dunnett (Anexo 3).

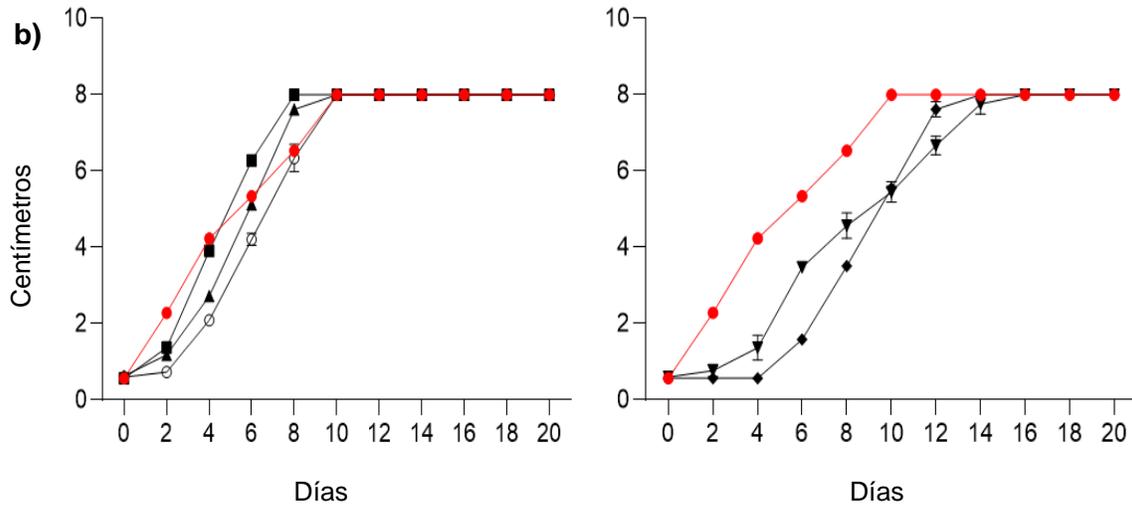
Resultados

Cinética de crecimiento en gasolina

Se determinó la cinética de crecimiento de *A. sydowii*-like, *P. sanguineus* y *T. atroviride* en diferentes concentraciones de gasolina artificial con medio mínimo y medio PDA como control positivo. Los resultados se muestran en la figura 3.



a) Cinética de crecimiento de *A. sydowii*-like, comparando 1%, 2.5%, 5% de gasolina contra el control (panel izquierdo) y 7.5% y 10% de gasolina contra el control (panel derecho).



b) Cinética de crecimiento de *P. sanguineus*, comparando 1%, 2.5%, 5% de gasolina contra el control (panel izquierdo) y 7.5% y 10% de gasolina contra el control (panel derecho).

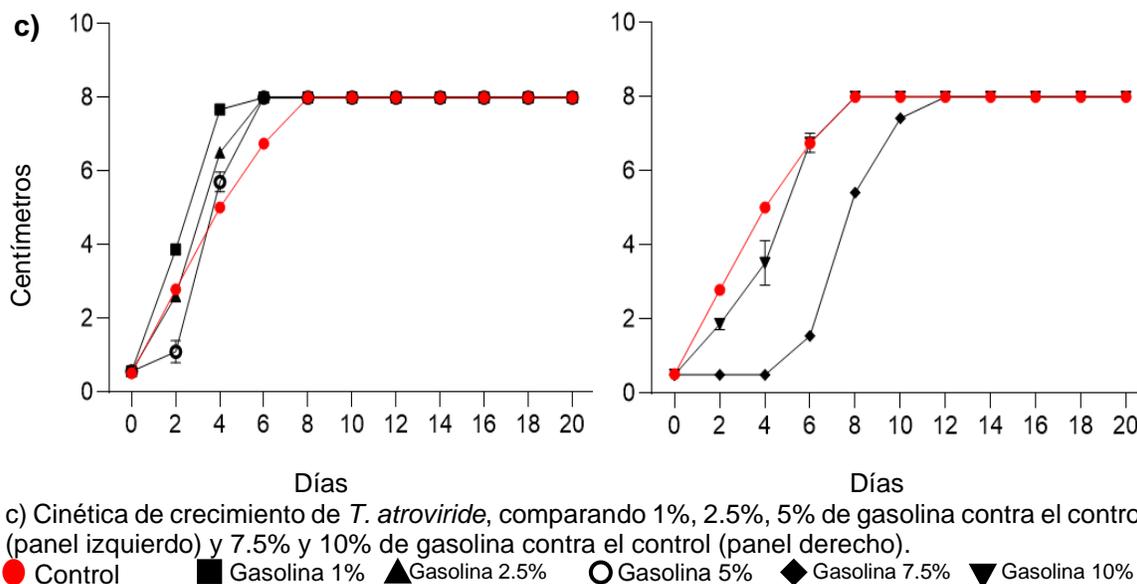


Figura 3. Cinética de crecimiento de a) *Aspergillus sydowii-like*, b) *Pycnoporus sanguineus*, c) *Trichoderma atroviride*, en diferentes concentraciones de gasolina.

Con los resultados mostrados en la figura 3 se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición. Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, estos indican que *A. sydowii-like* puede crecer hasta en 10% de gasolina, presentando una inhibición de crecimiento máxima de un 11.31%. Por otro lado, en los medios suplementados con gasolina a 12.5 y 15%, la inhibición del crecimiento de *A. sydowii-like* es total, es decir de 100%, no hubo crecimiento. El porcentaje de inhibición se empezó a observar en la concentración 7.5%, mientras que la tasa de crecimiento fue más alta en la concentración 2.5% de gasolina.

Por otro lado, para *P. sanguineus* se observa un porcentaje de inhibición máximo de 17.48%, siendo capaz de crecer hasta con un 10% de gasolina. De igual manera a las concentraciones 12.5 y 15% ya no se observa crecimiento e igualmente la tasa de crecimiento más alta fue a una concentración de 2.5% de gasolina.

Finalmente, en *T. atroviride* se observa que puede crecer hasta una concentración de 10%, teniendo un porcentaje de inhibición máximo de 30.46%, y teniendo una tasa de crecimiento mayor en medio suplementado con gasolina al 5%, en comparación con su crecimiento en medio PDA. Igualmente, ya no se observa crecimiento en 12.5 y 15% de gasolina.

	<i>A. sydowii-like</i>	<i>P. sanguineus</i> CelBMD001	<i>T. atroviride</i> Talcc3
PDA	0.292	0.715	0.860
Gasolina 1%	0.284	1.096	1.010
Gasolina 2.5%	0.315	0.850	1.365
Gasolina 5%	0.285	0.910	1.650
Gasolina 7.5%	0.288	0.616	0.750
Gasolina 10%	0.255	0.590	0.598
Gasolina 12.5%	0	0	0
Gasolina 15%	0	0	0

Tabla 3. Tasas de crecimiento a diferentes concentraciones de gasolina, en cm por día.

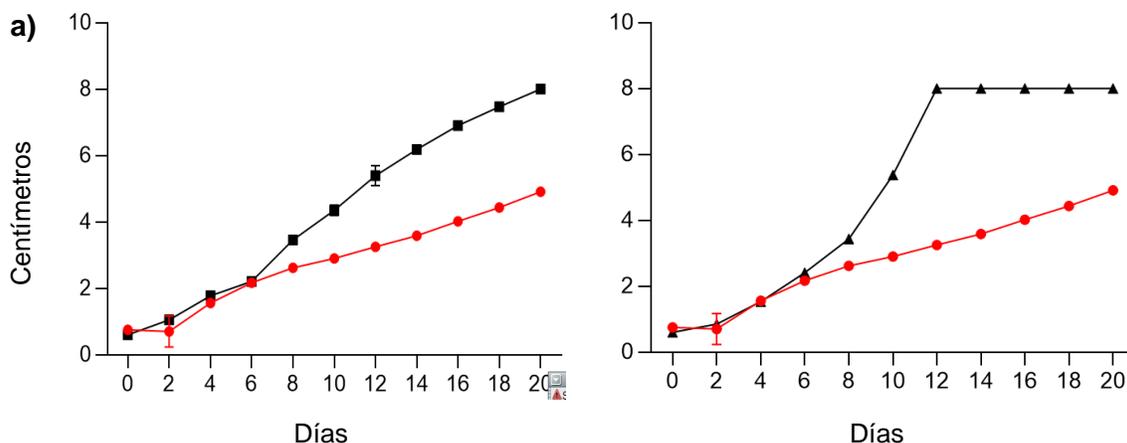
	<i>A. sydowii-like</i>	<i>P. sanguineus</i> CelBMD001	<i>T. atroviride</i> Talcc3
Gasolina 1%	0%	0%	0%
Gasolina 2.5%	0%	0%	0%
Gasolina 5%	0%	0%	0%
Gasolina 7.5%	1.52%	13.75%	12.79%
Gasolina 10%	11.31%	17.48%	30.46%
Gasolina 12.5%	100%	100%	100%
Gasolina 15%	100%	100%	100%

Tabla 4. Porcentajes de inhibición.

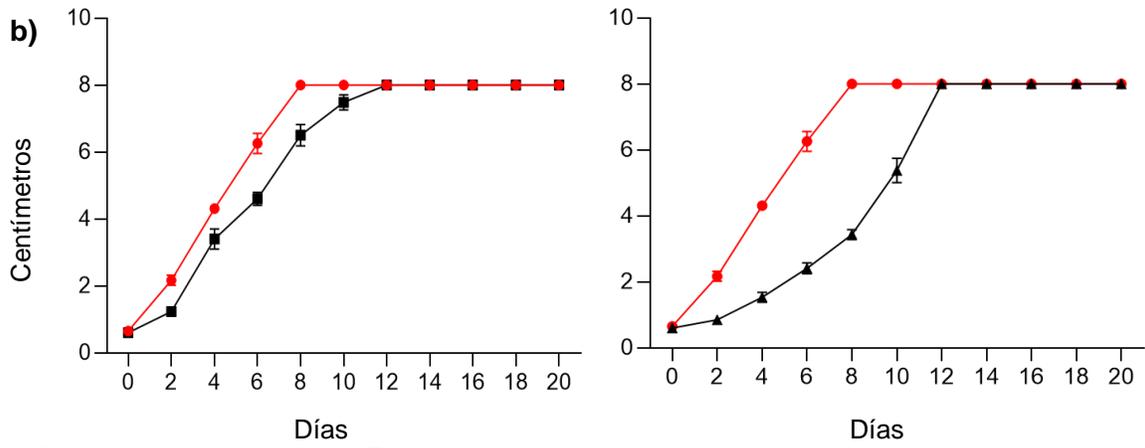
De acuerdo a estos resultados, y de acuerdo al análisis estadístico que arrojó diferencia significativa, se opta por utilizar al hongo que creció en menor tiempo y que tuvo las tasas de crecimiento más altas, para los experimentos en medio líquido: *Trichoderma atroviride*.

Cinética de crecimiento en polvo sorbente oleofílico

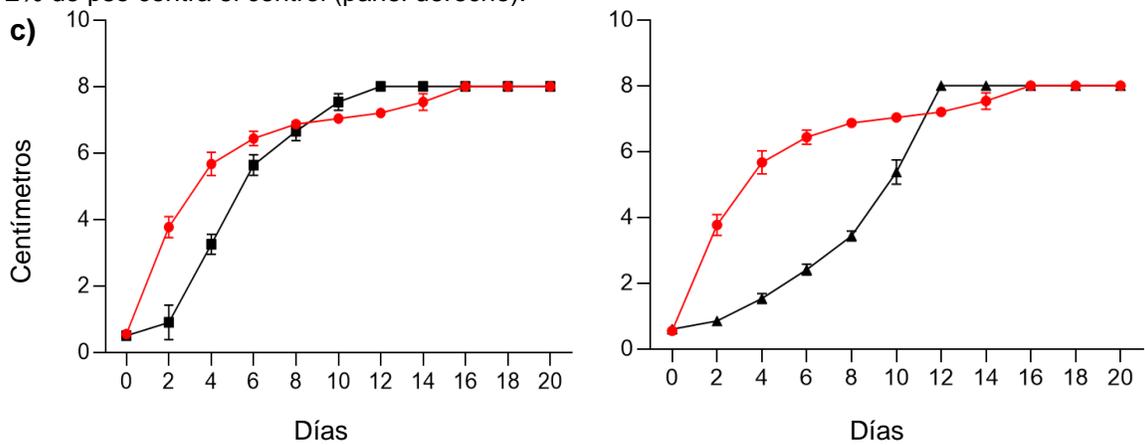
Se determinó la cinética de crecimiento de los tres hongos en polvo sorbente oleofílico con 1 y 2% en medio mínimo y en medio PDA como control. Los resultados se muestran en la figura 4.



a) Cinética de crecimiento de *A. sydowii-like* en 1% de pso contra el control (panel izquierdo) y 2% de pso contra el control (panel derecho).



b) Cinética de crecimiento de *P. sanguineus* en 1% de pso contra el control, (panel izquierdo) y 2% de pso contra el control (panel derecho).



c) Cinética de crecimiento de *T. atroviride* en 1% de pso contra el control, (panel izquierdo) y 2% de pso contra el control (panel derecho).

Figura 4. Cinética de crecimiento de a) *Aspergillus sydowii-like*, b) *Pycnoporus sanguineus*, c) *Trichoderma atroviride*, en polvo sorbente oleofílico 1 y 2%.

Asimismo, con los resultados mostrados en la figura 4 se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6.

Los resultados indican que *A. sydowii-like* puede crecer hasta en ambas concentraciones de polvo sorbente (1 y 2%), sin presentar inhibición alguna en ninguna condición para este experimento. Hay que hacer notar que la tasa de crecimiento mayor se observó en la concentración 2% en comparación con el medio control.

Ahora bien, *P. sanguineus* presenta un porcentaje de inhibición máximo de 6.29%, en la concentración 1%, no obstante, en la concentración 2% no se observa

inhibición aparente, por el contrario, la tasa de crecimiento aumenta casi el doble en comparación con el medio control.

Para *T. atroviride* se observa que puede crecer en ambas concentraciones 1 y 2%, sin presentar porcentaje de inhibición y con una tasa de crecimiento mayor en la concentración 2% en comparación con su crecimiento en medio PDA.

	<i>A. sydowii-like</i>	<i>P. sanguineus</i> CeIBMD001	<i>T. atroviride</i> Talcc3
PDA	0.288	0.715	0.860
PSO 1%	0.386	0.670	0.925
PSO 2%	0.710	1.150	1.135

Tabla 5. Tasas de crecimiento en concentraciones 1 y 2%, en cm por día.

	<i>A. sydowii-like</i>	<i>P. sanguineus</i> CeIBMD001	<i>T. atroviride</i> Talcc3
PSO 1%	0%	6.29%	0%
PSO 2%	0%	0%	0%

Tabla 6. Porcentajes de inhibición.

Cuantificación de las actividades enzimáticas

Se realizaron experimentos para determinar la actividad de lacasa y peroxidasa en el sobrenadante de los cultivos de *T. atroviride* TaLacc3 crecidos en medio líquido suplementado con 10% de los hidrocarburos BTX. Se tomaron muestras de los sobrenadantes de estos cultivos en los días 0, 3, 6, 9 y 12, para los tratamientos que contenían el hongo, y en los días 0, 6 y 12 para los tratamientos que contenían únicamente gasolina y polvo sorbente, con el fin de determinar qué porcentaje de gasolina se evapora por sí solo, y qué cantidad absorbe el polvo oleofílico, posteriormente se determinaron las actividades de lacasa y peroxidasa.

Cuantificación de la actividad de lacasa y peroxidasa en cultivos de *T. atroviride*

Para la cuantificación de lacasas se consideraron únicamente los tratamientos que contenían al hongo; Tratamiento A, B y E. En la figura 6 se observa que en los tratamientos que contenían el polvo sorbente oleofílico como única fuente de carbono se presentó la mayor actividad de lacasas al día 9 (10.96 U/L), mientras que para peroxidadas se observa en el día 3 (5.06 U/L).

De manera general, en el tratamiento E, (Mm + polvo sorbente + *T. atroviride*) se observó la mayor cantidad de actividad enzimática de lacasas (figura 5 a), de igual forma en la cuantificación de actividad peroxidasas (figura 6 b), también fue el tratamiento E el que tuvo mayor actividad, en comparación con los otros tratamientos.

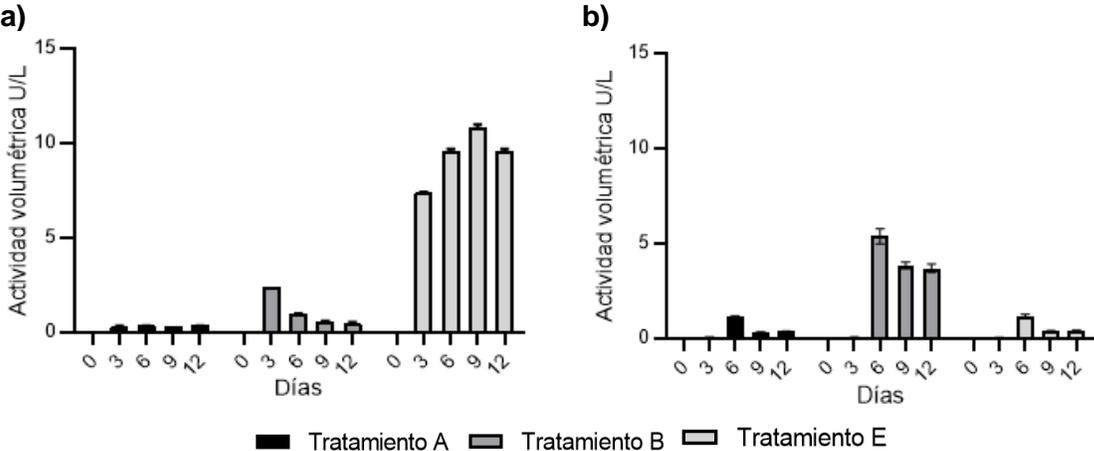


Figura 5. Actividad volumétrica de los tratamientos A, B y E, para a) lacasas, y b) peroxidasas

Cuantificación del peso seco

Para evaluar de forma directa el peso seco se consideraron también los tratamientos que contenían al hongo; tratamientos A, B y E, así mismo también se tomó en cuenta que en los tratamientos se colocaron 0.6 g iniciales de polvo sorbente y 0.1 g del inóculo de *T. atroviride*, en la siguiente figura se graficó el peso seco descartando esos 0.7 g iniciales de polvo sorbente e inóculo.

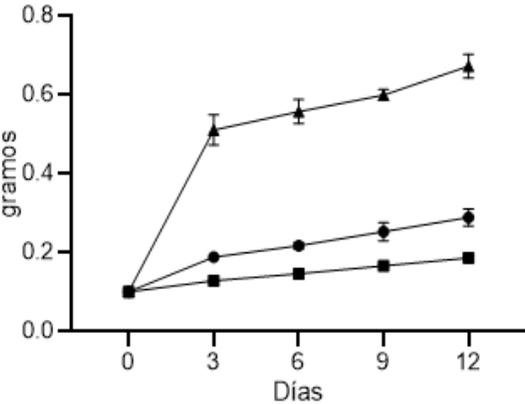


Figura 6. Peso seco de los tratamientos A, B y E

En los resultados obtenidos se observa que, el tratamiento con mayor peso fue el que tiene al polvo sorbente oleofílico como única fuente de carbono (E), en seguida está el tratamiento A que tiene al polvo sorbente oleofílico y a la gasolina, lo cual sugiere la toxicidad de ésta última y finalmente el tratamiento B que contiene como única fuente de carbono a la gasolina.

Determinación del porcentaje de remoción por HPLC

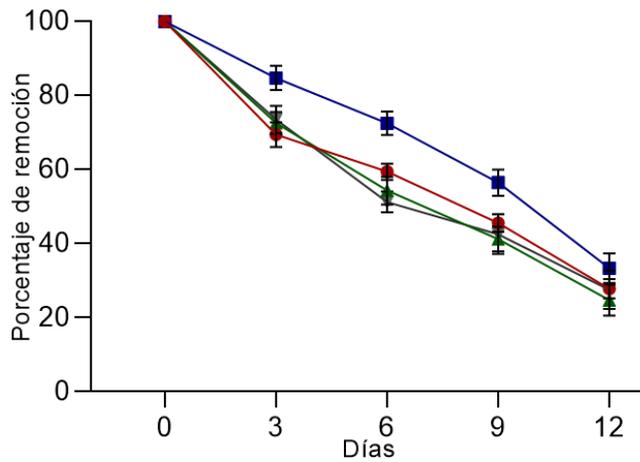
Con el objetivo de determinar el porcentaje de remoción de los hidrocarburos aromáticos por *T. atroviride*, se realizaron análisis por HPLC de los sobrenadantes de los cultivos de *T. atroviride* TaLcc3, suplementado con los hidrocarburos y/o con el polvo sorbente en distintos días del cultivo. Como se muestra en la figura 7, el análisis por HPLC muestra, los diferentes compuestos y sus respectivos porcentajes de remoción.

Cabe recalcar el objetivo de cada uno de los tratamientos; el tratamiento A, tenía como objetivo descifrar el comportamiento de las tres variables juntas (mezcla BTX, hongo y polvo sorbente oleofílico), el tratamiento b tenía como propósito observar únicamente el comportamiento de la mezcla BTX con el hongo; en el tratamiento C, se pretendía dilucidar qué tanto de la mezcla BTX estaba siendo absorbida por el polvo sorbente oleofílico, finalmente el tratamiento D tenía como objetivo descartar el porcentaje de mezcla BTX que estaba siendo evaporado al solo contener la mezcla en el medio mínimo en las mismas condiciones que los demás tratamientos.

Para el benceno, se observa una remoción máxima de 74%, para el día final de incubación. Por su lado, el tolueno llega a 70% de remoción en su último día. Y finalmente, el xileno llega hasta 80%.

En ninguno de los casos se obtuvo un porcentaje total de remoción, es decir, un 100%, sin embargo, se especula que fue debido al tiempo de incubación, ya que otros estudios demuestran una remoción total de este tipo de hidrocarburos hasta 20 días después de iniciado el tratamiento.

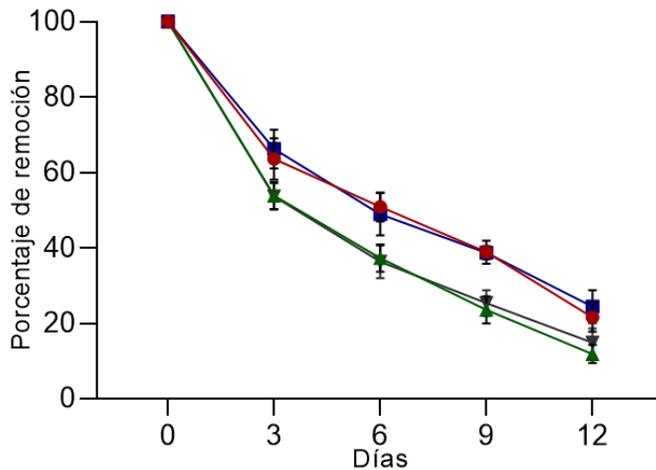
a)



Compuesto	Porcentaje máx. removido
● Benceno	74%
■ Tolueno	60.6%
▲ Xileno componente B	79.9%
▼ Xileno componente C	77.5%

a) Gráfica de porcentaje descendente de la mezcla BTX en el tratamiento A (medio mínimo, gasolina, hongo y pso)

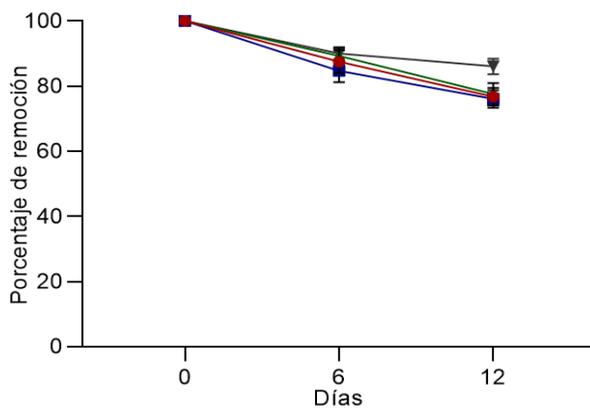
b)



Compuesto	Porcentaje máx. removido
● Benceno	79.2%
■ Tolueno	79.7%
▲ Xileno componente B	90.7%
▼ Xileno componente C	88.8%

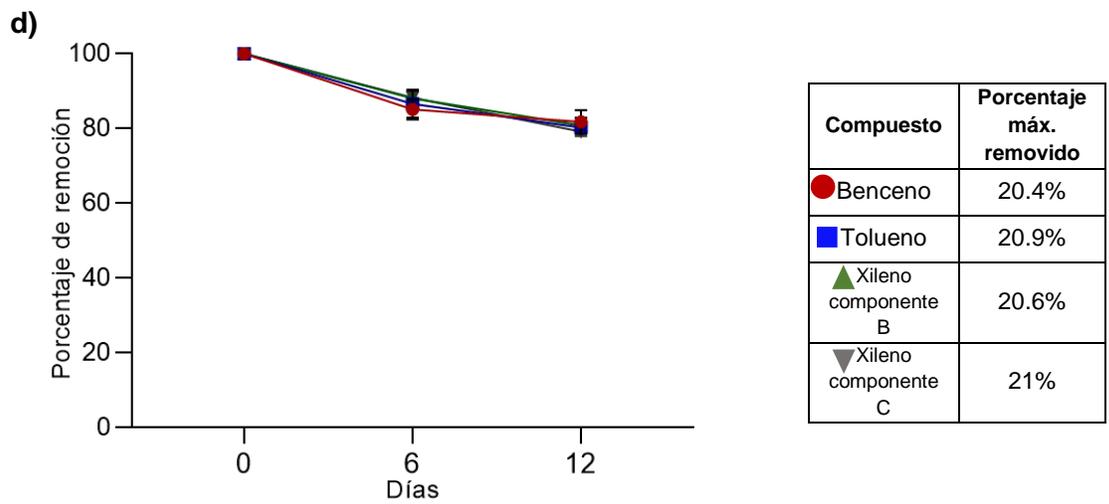
b) Gráfica de porcentaje descendente de la mezcla BTX en el tratamiento B (medio mínimo, gasolina y hongo).

c)



Compuesto	Porcentaje máx. removido
● Benceno	22.9%
■ Tolueno	26%
▲ Xileno componente B	26.2%
▼ Xileno componente C	16.4%

c) Gráfica de porcentaje descendente de la mezcla BTX en el tratamiento C (medio mínimo, gasolina y polvo sorbente oleofílico).



d) Gráfica de porcentaje descendente de la mezcla BTX en el tratamiento D (medio mínimo y gasolina).

Figura 7. Gráfica de remoción de la mezcla BTX en diferentes tratamientos

Discusión

En el presente proyecto de tesis hemos podido determinar que, tanto como *A. sydowii-like*, *P. sanguineus* como *T. atroviride* TaLacc3 son capaces de usar gasolina y sus componentes más tóxicos como única fuente de carbono, llegando a crecer con concentraciones de hasta 10%. Además, se observó que el crecimiento de los hongos fue mayor cuando los medios se suplementaron con polvo sorbente oleofílico, lo cual sugiere que el uso de los componentes de la gasolina ocurre a través de un co-metabolismo. Estos resultados son relevantes, porque concuerdan con reportes anteriormente descritos, en donde hongos filamentosos tienen la capacidad de usar hidrocarburos como única fuente de carbono (Dávila, 2006).

Como ya se ha mencionado, aunque son capaces de crecer tanto en gasolina magna como en gasolina artificial, es posible que, por un lado la preferencia por consumir lignina limite el consumo de gasolina magna, mientras que, por otro, la toxicidad de los componentes BTX de la gasolina artificial limiten la producción de las enzimas responsables de la remoción, dicho comportamiento ya fue descrito por Li en 2004, donde estudian la degradación de tricloroetileno utilizando gasolina como co-sustrato y observan que la degradación de la gasolina pasa a segundo término al tener una fuente de carbono más accesible (Li *et al*, 2004).

Como era de esperarse, debido a su naturaleza transgénica, *T. atroviride* produce la lacasa de *P. sanguineus*, pero además sus propias peroxidasas, lo que suponemos que le dio mayor potencial para crecer mejor que los otros dos hongos probados, en presencia de gasolina. En un estudio con *Trametes versicolor* se demostró que éste degrada fenantreno, con 5 U/ml de actividad de lacasas, en el caso de este estudio se obtuvo una remoción de 27.6% para benceno y 30% para xileno con 2.41 U/ml. En este trabajo de Tesis se obtuvieron se alcanzó una actividad de lacasa de más de 10U/L y una remoción de hasta entre el 66 y el 85% de remoción de diferentes componentes en el medio BTX, lo cual seguramente se debe a la adición del polvo sorbente oleofílico. Ahora bien, se ha demostrado que la producción de enzimas ligninolíticas como las peroxidasas, en *Bjerkandera adusta* cultivado sobre materiales lignocelulósicos como la viruta de madera, alcanza

valores de hasta 5,0 U/g por lo que resaltan que la inoculación con este tipo de materiales puede favorecer la degradación de suelos contaminados con hidrocarburos (Quintero et al, 2006).

Por otro lado, estudios con hongos de la podredumbre blanca tales como *Pleurotus* sp, han reportado hasta 18,72 U/L de actividad de peroxidasas cuando degradan hidrocarburos policíclicos aromáticos (Gómez et al., 2005). Estudios de biorremediación de aguas residuales reportan que *P. ostreatus* tiene actividad de Mn-Peroxidasa de hasta 0.45 U/L (Fernández y Henao, 2007), mientras que en este trabajo hemos obtenido hasta 0,34 U/L de actividad de peroxidasa durante la remoción de hasta un 60% de BTX.

El mecanismo enzimático para la degradación de hidrocarburos para hongos aislados de ambientes contaminados con petróleo ha sido estudiado por Naranjo et al., en 2007, en el que reportan la producción de enzimas ligninolíticas, principalmente de lacasa y lignina peroxidasa. En nuestro estudio hemos observado que, efectivamente hay actividad de lacasa y peroxidasa en los sobrenadantes de los cultivos de *T. atroviride* crecido con gasolina artificial y con polvo sorbente como únicas fuentes de carbono. Sin embargo, la cantidad de enzima producida es menor cuando se encuentran en conjunto estas dos fuentes de carbono. Esto podría deberse a que se activen otras vías de degradación como la del citocromo P450, pero habrá que probarlo.

Hay que hacer notar, que el objetivo de los tratamientos C y D fue evaluar el comportamiento de la gasolina artificial con el polvo sorbente oleofílico (Tratamiento C) y el comportamiento de la gasolina artificial por si sola (Tratamiento D), por lo que, después de realizar las extracciones con hexano se puede distinguir el aroma característico de la gasolina en los residuos de polvo sorbente, lo que podría concluirse es, que cierta cantidad de los hidrocarburos está siendo absorbida por el material lignocelulósico. No obstante, una vez que el polvo absorbe estos compuestos BTX, es probable que ahora el hongo se enfrente a la tarea de degradar un compuesto mayormente complejo (lignocelulosa y BTX), y le cueste más tanto la

producción de biomasa como la producción de enzimas para contender contra este nuevo complejo.

Ahora bien, en la relación que existe entre el crecimiento y la producción enzimática, vale la pena mencionar que, en el caso del tratamiento A, recapitulando que este tratamiento incluye al polvo sorbente y los compuestos BTX, aunque hay una menor producción enzimática, el crecimiento que se observa es mayor, esto puede deberse a que el hongo active otras vías de degradación y asimilación como se ha mencionado anteriormente (CYP450). Por otro lado, si bien el crecimiento es mayor en el tratamiento A, pero no la actividad enzimática, es importante mencionar que en el tratamiento B, que únicamente contiene los hidrocarburos con el hongo, el crecimiento es menor, pero constante, lo que puede significar que el hongo si consume los hidrocarburos, pero en una tasa mucho menor en comparación con el consumo de lignina.

Conclusión

Los hidrocarburos del petróleo son nocivos para la salud humana y los ecosistemas. Por este motivo, la remediación de sitios contaminados con petróleo es necesaria para restaurar la funcionalidad, ya sea para la preservación del medio ambiente o para el desarrollo urbano.

Las tecnologías utilizadas actualmente para eliminar contaminantes de hidrocarburos de ambientes naturales son costosas y, a menudo, se llevan a cabo directamente en el sitio, lo que también resulta ser laborioso e ineficiente. Las tecnologías *in situ*, por su parte, tienen sus desventajas inherentes, por ejemplo; la capacidad solo para tratar tipos de suelo específicos, y en algunas ocasiones el sitio no puede reinsertarse a su ambiente nativo después de la remediación.

Aunque estudios han demostrado que el lirio acuático *E. crassipes* puede trabajar en asociación con microorganismos para remediar las aguas contaminadas de petróleo crudo y, por lo tanto, servir como agentes de biorremediación (Omokeyeke *et al.*, 2013). En este estudio no existió diferencia significativa entre el tratamiento A (que contenía al hongo y al polvo de lirio, junto con la mezcla BTX) y el tratamiento B (que contenía únicamente al hongo con la mezcla BTX) en la remoción de hidrocarburos, según los resultados por HPLC. Sin embargo, si se observó diferencia significativa en cuanto a la producción de las enzimas detectadas (lacasas y peroxidasas), por lo que sería interesante utilizar al polvo como estimulante para *T. atroviride* y así obtener las enzimas necesaria para aplicarlas a enfoques futuros.

Entender a fondo la dinámica entre el polvo sorbente y los hidrocarburos es esencial para fundamentar experimentos a largo plazo. En los últimos años se ha vuelto tendencia utilizar mezclas sintéticas de hidrocarburos, como el BTX, que simulen la composición de las sustancias que se derraman accidentalmente en el ambiente, como por ejemplo el petróleo y la gasolina.

Anexos

Anexo. 1 Mezcla BTX

Los cálculos se realizaron para obtener el benceno, tolueno y xileno que se encuentra contenido en 10% de gasolina magna.

En 10% de gasolina, hay:

0.1108% benceno

0.87% tolueno

0.2676% xileno

El volumen final de cada matraz será de 30 ml, por lo que 10% de gasolina serán:

0.033 ml benceno

0.261 ml tolueno

0.080 ml xileno

Anexo 2. Medio mínimo

Preparación de 1 L de medio mínimo

CuSO_4 7.8 mg

FeSO_4 18 mg

MgSO_4 500 mg

ZnSO_4 10 mg

KCl 50 mg

H_2HPO_4 1 g

NH_4NO_3 2 g

Anexo 3. Análisis Estadístico

1. Cuadro de análisis de varianza para *A. sydowii-like* en gasolina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	P- Value
Interacción Tiempo-Tratamiento	12.5	50	0.3893		P<0.0001
Tiempo (Días)	562	10	53.07		P<0.0001
Tratamiento	29.3	5	8.29	(5,12)	P<0.0001
Total	603.8	65			

Test: Prueba de Dunnett, alpha 0.05

Comparación	Media	Valor P	Significancia
Control vs. Gasolina 1%	0.465	0.7774	No
Control vs. Gasolina 2.5%	0.616	0.5746	No
Control vs. Gasolina 5%	0.656	0.4905	No
Control vs. Gasolina 7.5%	0.908	0.1813	No
Control vs. Gasolina 10%	1.25	0.0219	Si

2. Cuadro de análisis de varianza para *P. sanguineus* en gasolina

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	P- Value
Interacción Tiempo-Tratamiento	79.4	50	1.59		P<0.0001
Tiempo (Días)	1540	10	154		P<0.0001
Tratamiento	48.4	5	9.68	(5,12)	P<0.0001
Total	1667.8	65			

Test: Prueba de Dunnett, alpha 0.05

Comparación	Media	Valor P	Significancia
Control vs. Gasolina 1%	-0.0927	0.9998	No
Control vs. Gasolina 2.5%	0.167	0.9989	No
Control vs. Gasolina 5%	0.455	0.9463	No
Control vs. Gasolina 7.5%	1.38	0.2188	No
Control vs. Gasolina 10%	0.619	0.8123	No

3. Cuadro de análisis de varianza para *T. atroviride* en gasolina

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	P- Value
Interacción Tiempo-Tratamiento	171	50	3.42		P<0.0001
Tiempo (Días)	1294	10	129		P<0.0001
Tratamiento	75.5	5	15.1	(5,12)	P<0.0001
Total	1540.5	65			

Test: Prueba de Dunnett, alpha 0.05

Comparación	Media	Valor P	Significancia
Control vs. Gasolina 1%	-0.462	0.9067	No
Control vs. Gasolina 2.5%	-0.245	0.9943	No
Control vs. Gasolina 5%	0.0317	0.9999	No
Control vs. Gasolina 7.5%	1.46	0.1949	No
Control vs. Gasolina 10%	0.139	0.9997	No

4. Cuadro de análisis de varianza para *A. sydowii-like* en polvo sorbente oleofílico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	P- Value
Interacción Tiempo-Tratamiento	66.0	20	3.30		P<0.0001
Tiempo (Días)	512	10	51.2		P<0.0001
Tratamiento	75.2	2	37.6	(2,6)	P<0.0001
Total	653.2	65			

Test: Prueba de Dunnett, alpha 0.05

Comparación	Media	Valor P	Significancia
Control vs. PSO 1%	-1.44	0.0121	Si
Control vs. PSO 2%	-2.09	0.0019	Si

5. Cuadro de análisis de varianza para *P. sanguineus* en el polvo sorbente oleofílico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	P- Value
Interacción Tiempo-Tratamiento	11.1	20	0.556		P<0.0001
Tiempo (Días)	733	10	73.3		P<0.0001
Tratamiento	5.35	2	2.68	(2,6)	P<0.0001
Total	749.45	32			

Test: Prueba de Dunnett, alpha 0.05

Comparación	Media	Valor P	Significancia
Control vs. PSO 1%	0.567	0.6073	No
Control vs. PSO 2%	0.237	0.9165	No

6. Cuadro de análisis de varianza para *T. atroviride* en el polvo sorbente oleofílico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	P- Value
Interacción Tiempo-Tratamiento	35.9	20	1.79		P<0.0001
Tiempo (Días)	607	10	60.7		P<0.0001
Tratamiento	8.26	2	4.13	(2,6)	P<0.0001
Total	651.16	32			

Test: Prueba de Dunnett, alpha 0.05

Comparación	Media	Valor P	Significancia
Control vs. PSO 1%	0.455	0.6975	No
Control vs. PSO 2%	-0.242	0.4856	Si

Referencias

1. Alrumman Sulaiman, Standing Dominic, y Paton Graeme. 2015. "Effects of Hydrocarbon Contamination on Soil Microbial Community and Enzyme Activity." *Journal of King Saud University - Science* 27 (1): 31–41.
2. Zuleta Aranguren Freddy, Burguera José Luis, Burguera Marcela, y Montilla Josefa. 2013. "Concentraciones de Plomo En Sangre y Orina de Trabajadores En Expendios de Gasolina." *Geoenseñanza, Universidad de Los Andes* 8 (2): 83–93.
3. Arroyo Maroto y Rogel Juan Manuel. 2010. "Aplicación de Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas Por Hidrocarburos", 297–305.
4. Atagana Harrison Ifeanyichukwu. 2008. "Compost Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil Inoculated with Organic Manure" 7 (10): 1516–25.
5. Bartha Richard. 2017. "Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation". *Springer Link* 91: 399–404.
6. Bhainsa Kuber and D'Souza S. 2006. "Biosorption by Dried Roots of *Eichornia crassipes* (Water Hyacinth)." *Journal of Environmental Science and Health* 36.
7. Bilal Muhammad, Asgher Muhammad, Parra-Saldivar Roberto, Hu Hongbo, Wang Wei, Zhang Xuehong, Hafiz Iqbalc. 2017. "Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants." 576: 646-659.
8. Buttress A.J., Binner E. , Yi C. , Palade P. , Robinson J.P. , Kingman S.W. 2016. "Development and evaluation of a continuous microwave processing system for hydrocarbon removal from solids." *Chemical Engineering Journal* 283: 215-222.
9. Carrera G., Fernández P., Vilanova R. M., & Grimalt J. O. 2001. "Persistent organic pollutants in snow from European high mountain areas." *Atmospheric Environment*, 35(2), 245–254. [http://doi.org/10.1016/S1352-2310\(00\)00201-6](http://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00201-6)

10. Carrión Cristóbal, Ponce de León Claudia, Silke Cram, Sommer Irene, Hernández Manuel, and Vanegas Cecilia. 2012. "Aprovechamiento Potencial Del Lirio Acuático (*Eichhornia crassipes*) En Xochimilco Para Fitorremediación de Metales." *Agrociencia* 46 (6): 609–20. doi:10.1300/J144v03n01.
11. Castillo-Hernández, Mendoza-Domínguez A., y Caballero-Mata P. 2012. "Análisis de Las Propiedades Físicoquímicas de Gasolina y Diesel Mexicanos Reformulados Con Etanol." *Ingeniería Investigación y Tecnología XIII* (3): 293–306.
12. Chikere C.B., G. C. Okpokwasill and B. O. Chikere. 2011. "Monitoring of Microbial Hydrocarbon Remediation in the Soil." *3 Biotech* 1: 117–38.
13. Corona Ramírez Lilia, and Iturbe Argüelles Rosario. 2005. "Atenuación Natural En Suelos Contaminados Con Hidrocarburos." *Ingeniería. Investigación y Tecnología* 2 (2): 119–26. <http://www.redalyc.org/pdf/404/40460203.pdf>.
14. Cruz-Narváez Yair, Rico-Arzate Enrique, Castro-Arellano José J, Noriega-Altamirano Gerardo, Piña-Escobedo Alberto, and Murugesan Selvasankar. 2019. "Obtaining Microorganisms in Cloud Forest Soils for the Degradation of Aromatic Hydrocarbons." *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* 25 (6): 95–106.
15. Curiel-Iñiguez Norma Patricia. 2018. "Análisis Del Efecto de La Contaminación Con Gasolina En Los Asentamientos Por Consolidación Secundaria En Una Arcilla Expansiva." *Universidad Autónoma de Querétaro*, 138.
16. Das Nilanjana, and Preethy Chandran. 2011. "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview." *Biotechnology Research International* 2011: 1–13. doi:10.4061/2011/941810.
17. Dávila-Vazquez Gustavo, and Vazquez-Duhalt Rafael. 2006. "Enzimas Ligninolíticas Fúngicas Para Fines Ambientales." *Mensaje Bioquímico* 30.
18. M Ellouze, S Sayadi 2016. White-rot fungi and their enzymes as a biotechnological tool for xenobiotic bioremediation. - *Management of*

- hazardous wastes. Hosam El-Din M. Saleh, Rehab Abdel Rahman, Eds. InTech: Rijeka, Croatia.
19. Evangelou Ebel, and Schaeffer M. 2007. "Cyanide Phytoremediation by Water Hyacinths (*Eichhornia crassipes*)." Information Systems Division, National Agricultural Library 66 (5): 823.
 20. Fedato R, Simonato J, Martínez C, and Sofia S. 2010. "Genetic Damage in the Bivalve Mollusk *Corbicula Fluminea* Induced by the Water-Soluble Fraction of Gasoline." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 700 (1–2): 80–85.
 21. Francesc X., Prenafeta-Boldú, Sybren de Hoog, and Summerbell Richard C. 2019. "Fungal Communities in Hydrocarbon Degradation", Springer
 22. Gómez Wilmar, Gaviria Jair, and Cardona Santiago. 2009. "Assessment of the Biostimulation against Bioaugmentation and Natural Attenuation on Contaminated Soil with Diesel-Gasoline Mixing." Universidad Nacional de Colombia 76 (160): 83–93.
 23. Haritash A, and Kaushik C. 2009. "Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)." Journal of Hazardous Materials 169 (1–3): 1–15.
 24. Higuchi Takayoshi. 1993. "Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes" Journal of Biotechnology 30 (1) 1-8.
 25. Karpouzias G., and Singh K. 2006. "Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis." Advances in Microbial Physiology 51 (225): 119–85.
 26. Kinnunen Anu, Maijala Pekka, JArvinen Paivi, Hatakka Annele, 2017, "Improved Efficiency in Screening for Lignin-Modifying Peroxidases and Laccases of Basidiomycetes", Ingenta 6: 105-115.
 27. Kirk T. Kent y Chang Hou-min. 2009. "Decomposition of Lignin by White-rot Fungi. II. Characterization of Heavily Degraded Lignins from Decayed Spruce" 29 (2).

28. Labud Valeria, Carlos García, and Hernández Teresa. 2007. "Effect of Hydrocarbon Pollution on the Microbial Properties of a Sandy and a Clay Soil." *Chemosphere* 66 (10): 1863–71.
29. Ledesma J., Arroyo L and Hernández J.L. 1994. "Análisis de La Contaminación Ambiental Por Derrames de Hidrocarburos En El Estado de Tabasco y Su Biorremediación Por Medio de Tecnología de Punta." *Toxicología Ambiental*.
30. Li Feng, Shen Kaixuan, and Long Kiaolin. 2016. "Preparation and Characterization of Biochars from *Eichornia crassipes* for Cadmium Removal in Aqueous Solutions." *PLOS ONE*.
31. Li Y., Li B., Wang C. P., Fan J. Z., & Sun H. W. 2014. "Aerobic degradation of trichloroethylene by co-metabolism using phenol and gasoline as growth substrates." *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 9134–9148.
32. Malherbe S., and Cloete T. 2002. "Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and Applications." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1 (105–114).
33. Marino S. 2016. "Hoja Datos de Seguridad Gasolina Pemex Premium." *Petróleos Mexicanos*.
34. Mastandrea Carlos, Chichizola Carlos, Ludueña Beatriz, Sánchez Héctor, Álvarez Horacio, y Gutiérrez Andrea. 2010. "Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Riesgos Para La Salud y Marcadores Biológicos." *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (1): 27–36.
35. Méndez-Matías Artemio. 2018. "Composting Agroindustrial Waste Inoculated with Lignocellulosic Fungi and Modifying the C / N Ratio" 9 (2): 271–80.
36. Mishra Vartika, Jana Asim K., Maiti Jana Mithu, Gupta Antriksh. 2017. "Enhancement in multiple lignolytic enzymes production for optimized lignin degradation and selectivity in fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse", *Bioresource Technology* 236: 49-69
37. Omokeyeke O, Sikoki F, and Nwachukwu E. 2013. "Phytoremediation Potential of an Aquatic Weed, *Eichornia crassipes*, in Crude Oil Contaminated Sites." *Life Sciences and Engineering* 3 (1): 125–30.

38. Ortega-Clemente Alfredo, Caffarel-Méndez S., Ponce-Noyola M., Barrera-Córtés H., and Poggi-Varaldo M. 2009. "Fungal Post-Treatment of Pulp Mill Effluents for the Removal of Recalcitrant Pollutants." *Bioresource Technology* 100 (6): 1885–94.
39. Pérez-Muñoz Yuliana, López-Martínez Sugely, Rodríguez-Luna Ana Rosa, and Ramos-Arcos Sebastián. 2019. "Evaluación de Impacto Socioambiental, Por Derrame de Petróleo de Un Ducto En Comalcalco, Tabasco." *Journal of Basic Sciences* 5 (15). <http://www.revistas.ujat.mx/index.php/jobs/article/view/3574>.
40. Pinos Carmen, González Erenio, Rojas Maira, Mesa Leyanis, and Batallas Fernando. 2018. "Empleo de Biocatalizadores En La Degradación de Material Lignocelulósico: Principales Impactos." *Revista Investigación y Desarrollo Ecuador* 1 (1). <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.799>.
41. Pointing S. B. 2001. "Feasibility of bioremediation by white-rot fungi." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:20-33.
42. Randy H., Adams S., Verónica I. 1999. "Bioremediation Potential of Oil Impacted Soil and Water in the Mexican Tropics." *Terra* 17: 159–74.
43. Reyes Guillermo G, Pupiales William E y Soria Cristian A. 2018. "Estudio de Emisiones Contaminantes Utilizando Mezcla de Gasolina e Hidrógeno Como Combustible." *Revista Científica y Tecnológica UPSE* 5: 19–28.
44. Riojas González Héctor H, Torres Bustillos Luis G, Mondaca Fernández Iram, Balderas Cortes José de Jesús, and Gortáres Moroyoqui Pablo. 2010. "Efectos de Los Surfactantes En La Biorremediación de Suelos Contaminados Con Hidrocarburos." *Química Viva* 9 (3): 120–45. doi:10.9780/23197943.
45. Rouches E. Herpoël-Gimbert I., Steyera H. Carrere P., 2016, "Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass." 59: 179-198
46. Saurabh M., y Abhijit M. 2017. "The Efficiency of *Eichhornia crassipes* in the Removal of Organic and Inorganic Pollutants from Wastewater." *Environmental Science and Pollution Research* Volume 24: 7921–7937.

47. Seyma Ozcirak y Raziye Urek, 2017, "Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*", *Annals of Agrarian Science* 15 (2) 273-277.
48. Solís Juan Carlos, and Pardo Claudia. 2017. "Consumo de Energía y Emisiones de CO₂ Del Autotransporte En México y Escenarios de Mitigación" 32 (1): 7–23.
49. Tang J., X. Lu Q. Sun, and W. Zhu. 2012. "Aging Effect of Petroleum Hydrocarbons in Soil under Different Attenuation Conditions." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 149 (109–117).
50. Truskewycz Adam, Gundry Taylor D, Leadin S Khudur, Kolobaric Adam, Taha Mohamed, Aburto-Medina Arturo, S Ball Andrew, and Shahsavari Esmaeil. 2019. "Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems — Fate and Microbial Responses," 1–20.
51. Velez Patricia, Gasca-Pineda Jaime y Riquelme Meritxell, 2020, "Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons" *Marine Environmental Research* 153:
52. Wild, C. P. (2014). "International Agency for Research on Cancer." <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00402->
53. Zhang Z., Gai L., Hou Z., Yang C., Ma C., Wang Z, Sun B., y He X. 2010. "Characterization and Biotechnological Potential of Petroleum-Degrading Bacteria Isolated from Oil Contaminated Soils." *Bioresource Technology* 101: 8452–56.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 21 de julio del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB UAEM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB UAEM

Dra. Patricia Mussali Galante CEIB UAEM

Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC UAEM

Dra. Marcela Ayala Aceves IBT UNAM

Tesis: **Evaluación de tres hongos con potencial de biorremediación de gasolina magna en presencia de un polvo sorbente oleofílico.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Laura Daniela Torres Juárez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2020-07-28 12:45:07 | Firmante

EIXoeSqcDt0muL9sHTTzUQJ2x03NVCPZzg3VymfDp9pMZxySpqBzaBPwqFNQJYMNd1FPI3yiGsuTw0UeWA6ELv1Fkmg1vYckPRr8mMBVquXIZelqcVmMKVfNAZgmSG272bdE8coicT3j|CIUmrn/z1EmllnMs0i6j12ElggxeEyzBogf9jevC3k2KH8Z8185kB+pe0Eu3gaQ6OujPSM1zOgBr4BhEukC63WpDvYFgUuUixrBR8Br95bZWbbTyxobi0I1VVwon7RkC/sn4WrvO5tx+RAIII37ArTHL62w3xruXy44ZuenDMmowgy3nlqm9NI5WbbItXfvDzZNYnKMA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



7B4xv1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JU6QBW6FoLY5nrKqq12RSs1Njn8V2wrM>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 21 de julio del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB UAEM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB UAEM

Dra. Patricia Mussali Galante CEIB UAEM

Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC UAEM

Dra. Marcela Ayala Aceves IBT UNAM

Tesis: **Evaluación de tres hongos con potencial de biorremediación de gasolina magna en presencia de un polvo sorbente oleofílico.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Laura Daniela Torres Juárez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2020-07-28 00:22:17 | Firmante

url1d0F+ZDgqL.GOKBt8mCLZZ7lqH28DgV6ELwyeK+xnJ/QD5muwEgmzEpW5j94p/6iKw8PoUG16R3v5ZSWHPLs9f7LrO596x1Xp/zsgEyWolJDWxAL+1FaPPtZX6f99vwsFbpQegtBu4nMjmnH/t0Awt+f1On9a8fmAcmT/gO5uSHPghqSve1tlUnr8TtggGdyFujEN5VntbABXWhR8M/WC9bJD4oQuzHV9G8BjdgJ66cuWYS4FOQG+qS0B3tCqpAtn2w3iZnWYpOxGcTISu/Zpr0zjcaGHnCDUPV8/iKt7DdpBEtv2GgeYOi2r1EHK5254VsfUQ2TA4aqJAKHboA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pwxJVB](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Ja9L2jsrOvu3dDL0VYutwpjHjyEvW6b7>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 21 de julio del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB UAEM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB UAEM

Dra. Patricia Mussali Galante CEIB UAEM

Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC UAEM

Dra. Marcela Ayala Aceves IBT UNAM

Tesis: **Evaluación de tres hongos con potencial de biorremediación de gasolina magna en presencia de un polvo sorbente oleofílico.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Laura Daniela Torres Juárez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2020-07-31 13:01:56 | Firmante

QWu37uvjRU9J6Ec3jUW2v+Dgg3zYTz5hnlIFOVe5023yvmr4/lnRFzt29op1EeORCXVv7Ho5C2vLgX8btTyExdpUk56dC+tTCBRAFRKiVG92jE4ahiWLT03ti5xACiZgJhgJY9x6ovnC+KHcXPP052ic6KEwFQWZm4qERcdZwk8x6OQKIhrFRx1jeROoafUpcGbBn8NofjtL2WGXEX+dTFAhj5buY7LXleJ2f5oWlgeGKSKfyNCog0hpLf7bb8nag6g4/04X2CWjvjdut4csJ3QaxCniZe/nPFNIIndfw7UFx7b7JgVnhodfRYq5JojlVy7HKmWmw/92TA9F2RMbw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



BA4fmi

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Nf8frZvlZ38xIHO5XfLdBjqUdEya76CJ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 21 de julio del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB UAEM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB UAEM

Dra. Patricia Mussali Galante CEIB UAEM

Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC UAEM

Dra. Marcela Ayala Aceves IBT UNAM

Tesis: **Evaluación de tres hongos con potencial de biorremediación de gasolina magna en presencia de un polvo sorbente oleofílico.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Laura Daniela Torres Juárez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 21 de julio del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB UAEM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB UAEM

Dra. Patricia Mussali Galante CEIB UAEM

Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC UAEM

Dra. Marcela Ayala Aceves IBT UNAM

Tesis: **Evaluación de tres hongos con potencial de biorremediación de gasolina magna en presencia de un polvo sorbente oleofílico.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Laura Daniela Torres Juárez**
Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARCELA AYALA ACEVES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARCELA AYALA ACEVES | Fecha:2020-08-04 15:54:12 | Firmante

xHjdibdkLHNltG6naWcZKISSo63T5V4o/gtoRT1PAf+MyC8EA5n8APlgHWU6S6XiQFobpd59tsrbJ0gvNqL4jmDc58V4UoS5FskEFMUAWqd6O+vbwQnVtbBh7X4st/I51lp8G7VYtl
m9X0QH+anBpYdQO/+6ulwzRaqIHLVAEaddX2qV7z9Se1jab6WSPZcAlegOCPKF0GFllXbPQ+QyE5HMtSUuYnSCArQ8eUGv5BSWwM/C01AFDWJKUzywFVO+uipEVTODnrQ
wy14rto3kxIH1KlcZ2kWU07Mz6oEoz9zOgNh3vwqi8GMiyfb2IGzUkzZ6rQ6J17REU/fwLSreEw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



9SutgY

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ggAthDfjcJQqbx4k8FuE8LY2wjQru3f6>

