



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICA Y
APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

TÍTULO DE LA TESIS

“Degradación en condiciones hipersalinas de hidrocarburos policíclicos aromáticos y compuestos farmacéuticos mediante las cepas halófilas *Aspergillus sydowii*-like H1 y *Aspergillus destrudens* EXF10411”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
DEBORAH GONZÁLEZ ABRADELO

Director de la Tesis:
DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA

Cuernavaca, Morelos

Agosto, 2018

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	3
LISTA DE TABLAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
1. ANTECEDENTES	11
1.1. Hidrocarburos y contaminación	11
1.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos	13
1.3. Fenantreno y benzo (a) pireno	19
1.4. Compuestos farmacéuticos	21
1.5. Aguas contaminadas por HPAs y compuestos farmacéuticos	25
1.6. Métodos biológicos para el tratamiento de aguas contaminadas	26
1.7. Microorganismos degradadores de HPAs y compuestos farmacéuticos	28
1.8. Hongos halófilos	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Microorganismos y reactivos	35
2.2. Medios de cultivo y soluciones stock	35
2.3. Crecimiento óptimo en presencia de HPAs en condiciones hipersalinas	37

2.4.	Tolerancia de <i>A. sydowii-like</i> y <i>A. destrudens</i> a diferentes concentraciones de HPAs	38
2.5.	Remoción de HPAs en medios de cultivos sintéticos y aguas residuales	39
2.6.	Remoción de compuestos farmacéuticos en medios de cultivos sintéticos	41
2.7.	Cuantificación de la concentración de enzimas extracelulares en la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en medios sintéticos y aguas residuales	42
2.8.	Ensayos toxicológicos	43
2.9.	Diseño experimental y análisis estadístico	44
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1.	Crecimiento de <i>A. sydowii-like</i> y <i>A. destrudens</i> en presencia de benzo (a) pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas	45
3.2.	Remoción de benzo (a) pireno y fenantreno en medios sintéticos y aguas residuales	48
3.3.	Remoción de compuestos farmacéuticos en medios sintéticos	52
3.4.	Cuantificación de actividades enzimáticas	54
3.5.	Ensayos toxicológicos	59
	CONCLUSIONES	64
	PERSPECTIVAS	65
	Anexo: Perspectivas	66
	REFERENCIAS	70

RESUMEN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son sustancias liposolubles que se forman como consecuencia de la combustión, el tratamiento del carbón residual, y la actividad petro-química, entre otras causas. Por otra parte, los compuestos farmacéuticos son sustancias bioactivas con una amplia distribución ambiental como consecuencia de su extensivo uso, incluso indiscriminado. En los últimos años, existe un interés creciente en el uso de la biotecnología con el objetivo de restaurar los ecosistemas contaminados con xenobióticos. En la literatura son pocos los reportes que hablan de los hongos extremófilos para la remoción de contaminantes, a pesar de que muchos ambientes contaminados con HPAs y compuestos farmacéuticos presentan características fisicoquímicas extremas, como elevada salinidad. Esta peculiaridad constituye un desafío adicional para las estrategias de biorremediación, y demandan del uso de organismos extremófilos. El objetivo del presente trabajo es: Evaluar en condiciones hipersalinas, tanto en medios sintéticos como en aguas residuales, la remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos y compuestos farmacéuticos, mediante las cepas halófilas *Aspergillus sydowii*-like H1 y *Aspergillus destrudens* EXF-10411. En este trabajo se caracterizaron las actividades enzimáticas lacasa, esterasa y peroxidasa, durante la remoción de los contaminantes, y finalmente, se evaluó la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en mezclas y en presencia de condiciones hipersalinas (>1M NaCl). La toxicidad residual post-tratamiento se evaluó a través de ensayos de germinación de plántulas de pepino (*Cucumis sativus*). Ambas cepas demostraron ser efectivas en la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en presencia de condiciones hipersalinas; también fueron capaces de expresar enzimas extracelulares (lacasas, esterases y peroxidasas) en estas condiciones. Siendo este el primer estudio que reporta la remoción de estos xenobióticos en condiciones de halofilia.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) are liposoluble substances that are formed because of combustion and the treatment of residual carbon, among other causes. On the other hand, pharmaceutical compounds are bioactive substances with a wide environmental distribution because of their extensive, even indiscriminate use. In recent years there is growing interest in the use of biotechnology with the aim of restoring ecosystems contaminated with xenobiotics. In the literature there are practically no reports on the potential of extremophile fungi for the removal of contaminants, although many environments contaminated with HPAs and pharmaceutical compounds have extreme physical-chemical characteristics, such as high salinity. These peculiarities constitute an additional challenge for bioremediation strategies and demand the use of extremophile organisms. The aim of the present work is: To evaluate, in hypersaline conditions, in both synthetic media and wastewater, the removal of aromatic polycyclic hydrocarbons and pharmaceutical compounds, by the halophilic strains *Aspergillus sydowii*-like H1 and *Aspergillus destrudens* EXF-10411. While *Aspergillus sydowii*-like H1 is a moderate halophilic fungus, *Aspergillus destrudens* EXF-10411 is an obligate halophilic fungus. In this work the enzymatic activities (laccase, esterase and peroxidase), were characterized during the removal of contaminants, and finally, the removal of HPAs and pharmaceutical compounds in mixtures in the presence of hypersaline conditions (> 1M NaCl) was evaluated. Post-treatment was evaluated through germination trials of cucumber seeds (*Cucumis sativus*). Both strains proved to be effective in the removal of HPAs and pharmaceutical compounds in the presence of hypersaline conditions, they were also able to express extracellular enzymes (laccases, esterases and peroxidases) under these conditions. This being the first study investigating the removal of these xenobiotics in halophilic conditions.

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- AEM: Agar Extracto de Malta
- BaP: Benzo (a) pireno
- Biads: Bioadsorción
- Biodg: Biodegradación
- BPDE: Benzo-pireno-diol epóxido
- BSA: Seroalbúmina Bovina
- CG-SM: Cromatografía de gases con detector de masas acoplado
- CONAGUA: Consejo Nacional del Agua
- COX: Enzimas ciclooxigenasas
- Cyt P450: Citocromo P-450
- E.U.A: Estados Unidos de América
- EFSA: Grupo de Expertos de Contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EH: Epóxido hidrolasa
- EIA: Estudio del impacto ambiental
- EPA: Agencia de Protección Ambiental de los EUA
- ESI: Electrospray positiva
- Fen: Fenantreno
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HPAs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos
- IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

- JECFA: Aditivos Alimentarios
- LiPs: Lignino peroxidasas
- LMP: Límite máximo permisible
- MnP: Manganeso peroxidasa
- NaCl: Cloruro de sodio
- NTP: Programa Nacional de Toxicología
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PEMEX: Petróleos Mexicanos
- PhCos: Compuestos farmacéuticos
- PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
- QR: Quinona reductasa
- Rem: Remoción
- SDL: Sistema de degradación de lignina
- ST: Sulfotransferasa

LISTA DE TABLAS

1	Propiedades de los 16 HPAs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la US-EPA	17
2	Algunos compuestos orgánicos degradados por enzimas ligninolíticas (Quintero Díaz, 2011).	30
3	Referencias de cepas fúngicas que degradan HPAs	30
4	Referencias de cepas fúngicas que degradan PhCo	31
5	Velocidades específicas de crecimiento y tolerancia en presencia de benzo (a) pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas a los 20 días.	45
6	Degradación, adsorción al micelio y remoción total de benzo (a) pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas a los 12 días	48
7	Remoción de HPAs presentes en las aguas residuales mediante las cepas <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> a los 12 días del experimento	51
8	Remoción (%) de compuestos farmacéuticos a los 7 días del experimento para las cepas <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i>	53
9	Valores de actividad enzimática lacasa (Lac.), peroxidasa (Perx.) y esterasa (Est.) las cepas <i>A. destrudens</i> y <i>A. sydowii</i> en medio sintético con HPAs a los 4-8 y 12 días	55
10	Valores de actividad enzimática lacasa (Lac.), peroxidasa (Perx.) y esterasa (Est.) las cepas <i>A. destrudens</i> y <i>A. sydowii</i> en aguas residuales reales a los 4-8 y 12 días	56
11	Valores de actividad enzimática lacasa (Lac.), peroxidasa (Perx.) y esterasa (Est.) las cepas <i>A. destrudens</i> y <i>A. sydowii</i> en medios sintéticos con compuestos farmacéuticos a los 1, 4 y 7 días	58
12	Valores del crecimiento de las plántulas de pepino en presencia de los controles – y +, así como de los sobrenadantes a tiempo final del experimento (Tiempo 12) de los medios sintéticos con HPAs tratados con <i>A. sydowii</i> y <i>A. destrudens</i>	59
13	Valores del crecimiento de las plántulas de pepino en presencia de los controles – y +, así como de los sobrenadantes a tiempo final del experimento (Tiempo 12) de aguas residuales reales tratados con <i>A. sydowii</i> y <i>A. destrudens</i>	61

14 Valores del crecimiento de las plántulas de pepino en presencia de los controles – y +, así como de los sobrenadantes a tiempo final del experimento (Tiempo 7) de los medios sintéticos con compuestos farmacéuticos tratados con *A. sydowii* y *A. destrudens*

62

LISTA DE FIGURAS

1	Clasificación de los hidrocarburos	11
2	Estructura tridimensional del benceno con enlaces π por encima y por debajo del anillo.	13
3	Ejemplos de fuentes que generan HPAs	14
4	Movilidad de los HPAs en el ambiente	16
5	Compuestos farmacéuticos más frecuentes encontrados en el medio ambiente (Quesada <i>et al.</i> , 2009)	23
6	<i>A. sydowii</i> -like: (A) Remoción total de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 0, 4, 8 y 12 del experimento. (B) Bioadsorción y biodegradación de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 4, 8 y 12 del experimento	49
7	<i>A. destrudens</i> : (A) Remoción total de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 0, 4, 8 y 12 del experimento. (B) Bioadsorción y biodegradación de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 4, 8 y 12 del experimento	50
8	Valores de actividades enzimáticas lacasas (A), peroxidasas (B) y esterases (C) de <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> en medio sintético con HPAs a los 4-8 y 12 días	55
9	Valores de actividades enzimáticas lacasas (A), peroxidasas (B) y esterases (C) de <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> en aguas residuales reales a los 4, 8 y 12 días	56
10	Valores de actividades enzimáticas lacasas (A), peroxidasas (B) y esterases (C) de <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> en medios sintéticos con compuestos farmacéuticos a los 1, 4 y 7 días	58
11	Ensayos toxicológicos en semillas de pepino con sobrenadantes de <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> a los 0 y 12 días del experimento con medios sintéticos con HPAs	60
12	Ensayos toxicológicos en semillas de pepino con sobrenadantes de <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> a los 0 y 12 días del experimento con aguas residuales reales	61
13	Ensayos toxicológicos en semillas de pepino con sobrenadantes de <i>A. sydowii</i> -like y <i>A. destrudens</i> a los 0 y 7 días del experimento con compuestos farmacéuticos	62

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En términos ecológicos la contaminación ambiental se considera como el resultado del desequilibrio producido por la presencia, en cantidades críticas, de un agente externo dentro de un sistema particular. La existencia de estos agentes causa efectos no deseados y se refleja en el equilibrio biótico y abiótico de un ecosistema determinado (Fernández *et al.*, 2009). El desarrollo industrial de las últimas décadas ha implicado la liberación de grandes cantidades de compuestos químicos residuales, entre los que se destacan los HPAs y los compuestos farmacéuticos, los cuales presentan una elevada toxicidad y limitada posibilidad de biodegradación en los ecosistemas naturales (Majeau *et al.*, 2010).

Hasta la fecha existen numerosos estudios relacionados con la biodegradación/mineralización de estos compuestos, fundamentalmente en géneros bacterianos y hongos basidiomicetos, específicamente en aquellos conocidos como hongos de la podredumbre blanca (Bonugli-Santos *et al.*, 2015). Sin embargo, para los ascomicetos y los hongos halófilos no existen estudios realizados. Los hongos poseen una gran versatilidad fisiológica que les permite realizar cambios en los ambientes que colonizan, deendiendo de las características del sustrato y de las condiciones ambientales existentes.

Hasta la fecha se ha reportado que hongos de la podredumbre blanca, como es el caso de *Phanaerochaete* sp. y *Trametes* sp., son capaces de crecer en presencia de hasta 30 mg/L de HPAs (pireno y fenantreno) pero en medios suplementados con extracto de malta. Ambos microorganismos en presencia de estos compuestos presentan un porcentaje mínimo de inhibición en su crecimiento, por lo que fueron propuestos como agentes potenciales para la biodegradación de HPAs (Lee, *et al.*, 2014). Estos hongos descomponen estos compuestos mediante la utilización de las enzimas extracelulares como lacasas y peroxidasas (Haritashi and Kaushik, 2009). Las especies del género *Aspergillus* se consideran dentro de un grupo importante para el estudio de la degradación de HPAs tanto de bajo peso molecular (2 o 3 anillos aromáticos) como de alto peso molecular (4 a 7 anillos aromáticos) (Haritashi, *et al.*, 2009). Especialmente, se han aislado y descrito algunas especies del género *Aspergillus* como halotolerantes o halófilas, entre las que se encuentran *A. niger*, *A. sydowii*, *A. flavus*, *A. tubingensis* y *A. versicolor*. *Aspergillus* destaca de otros microorganismos debido a que algunas especies pueden crecer en condiciones extremas de

cultivo como, por ejemplo: amplios intervalos de temperaturas (10-50°C), pH (2-11) y salinidad (0-34%), entre otras (Meyer *et al.*, 2011).

Estudios previos realizados por Batista-García y colaboradores del 2014 al 2016, están enfocados a la búsqueda de hongos halófilos y halotolerantes con actividades ligninolíticas. Lograron aislar cepas filamentosas, las cuales fueron identificadas como *Aspergillus sydowii*-like H1, *Cadophora* sp. TS2, *Emericellopsis* sp. TS11 y *Pseudogymnoascus* sp. TS12 y *Aspergillus destrudens* EXF-10411 atendiendo a criterios taxonómicos, micromorfológicos y moleculares. Experimentos realizados mostraron un crecimiento de estas cepas ante la presencia de elevadas concentraciones de NaCl y la capacidad de producir enzimas extracelulares como peroxidasas, celulasas, esterasas y lacasas (Batista-García *et al.*, 2014). Adicionalmente estas cepas halófilas crecen en medios hipersalinos con benzo (a) pireno o fenantreno como única fuente de carbono (concentración final 10 ppm) (Batista-García *et al.*, 2017). Cabe destacar que estas características son de gran importancia para el uso de estas cepas en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con HPAs, debido a la presencia en aguas residuales de altas concentraciones de NaCl (> 0.5M) ocasionada por la acumulación de HPAs.

Para el caso específico de *Aspergillus sydowii*-like, adicionalmente a las potencialidades mencionadas anteriormente, también podemos agregar que fue aislado de la fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar. Estudios realizados ante la presencia de diferentes concentraciones de NaCl mostraron, que las actividades enzimáticas no variaban; se evidenciaron actividades de celulasas, esterasas, peroxidasas y lacasas. Batista y colaboradores en 2017 evidenciaron que *A. sydowii*-like es capaz de crecer en presencia de xenobióticos presentes en aguas residuales, sin embargo, se requiere continuar la caracterización de cómo este hongo crece con HPAs como única fuente de carbono y cuáles son las actividades enzimáticas que requiere para poder metabolizarlos. *A. destrudens* por su parte, cuenta hasta la fecha con poca información. Se conoce que necesita para su crecimiento concentraciones de NaCl de 1.89 M, que fue aislado de la superficie de una pintura de caballete (cuadro) y que tiene la capacidad de soportar estrés a bajas o ninguna concentración de agua, por lo que se considera un bi-extremófilo (xerófilo y halófilo).

Hasta la fecha existen algunos estudios realizados por los laboratorios de Fisiología Molecular de Hongos Extremófilos del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM (México), el Departamento de Biología de la Facultad de Biología de la Universidad de Ljubljana (Eslovenia) y el Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Sherbrooke (Canadá), enfocados en determinar la tolerancia de cepas halófilas y halotolerantes ante la presencia de diferentes HPAs y compuestos farmacéuticos en diferentes concentraciones de salinidad, sirviendo de precedente para profundizar en los estudios referentes a los mecanismos enzimáticos presentes en los procesos de biodegradación ante concentraciones de $\text{NaCl} \geq 0.5 \text{ M}$, concentración final de HPAs: 100 ppm de una relación 1:1 de benzo (a) pireno y fenantreno) y de concentraciones establecidas de una mezcla de compuestos farmacéuticos por cepas pertenecientes a la división Ascomycota. Lo mencionado anteriormente nos muestra el camino ya recorrido y el que nos queda por recorrer en la búsqueda de los mecanismos bioquímicos presentes en las cepas en estudio, brindando de esta forma la importancia de las mismas en los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con xenobióticos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. Hidrocarburos y contaminación

Los hidrocarburos son compuestos formados únicamente por carbono e hidrógeno; sus cadenas de átomos de carbono pueden ser lineales o ramificadas y abiertas o cerradas. Atendiendo a la naturaleza de los enlaces entre los átomos de carbono, los hidrocarburos pueden clasificarse en dos tipos: alifáticos y aromáticos (Figura 1). Los hidrocarburos alifáticos carecen de anillos aromáticos y se clasifican en alcanos, alquenos y alquinos, en dependencia del tipo de enlace presente entre los átomos de carbono: simple, doble y triple, respectivamente. Los hidrocarburos aromáticos presentan fusionadas una o varias moléculas de benceno, los cuales pueden presentar sustituyentes como azufre, nitrógeno u otros grupos químicos como grupos amidas, aminas, y carboxilos, entre otros (E. Clar, 1964 y Revista Petroquímica, 2016).

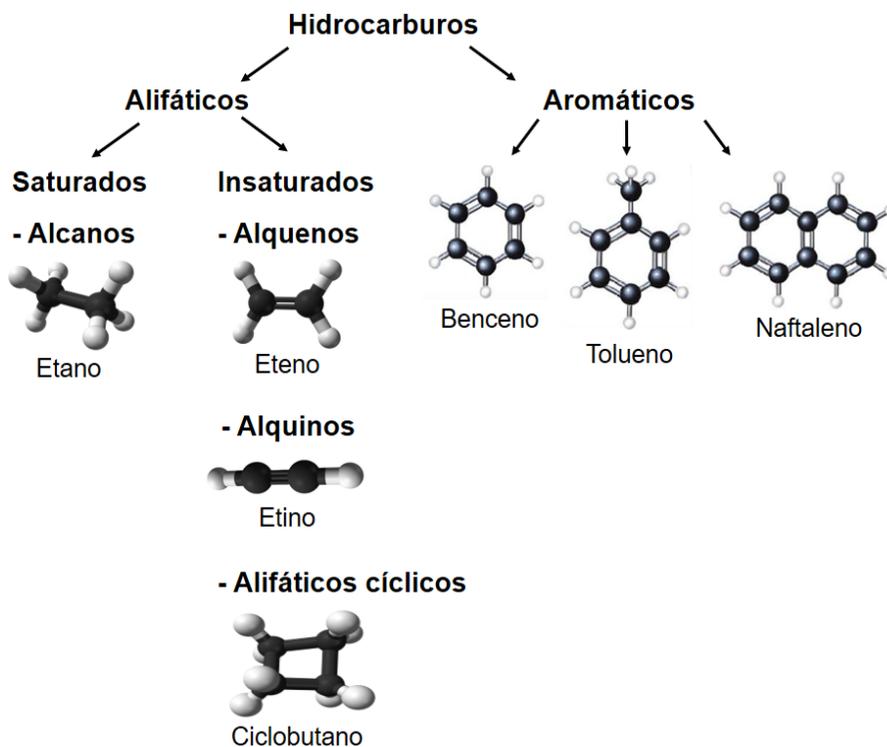


Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos.

La contaminación por hidrocarburos se puede evidenciar en diferentes ecosistemas, tales como: ríos, lagos, mares, suelos y aire (Carrera *et al.*, 2001). De manera general el aire es la vía principal de exposición a los hidrocarburos, ya que los mismos se encuentran en estado

gaseos en el aire y esto les permite depositarse en el suelo y/o en los cuerpos de agua. La deposición de los hidrocarburos en general está relacionada con sus propiedades fisicoquímicas, siendo capaces de adherirse, sedimentarse y/o solubilizarse parcialmente en dependencia de su peso molecular y complejidad estructural. La solubilidad de los hidrocarburos es inversamente proporcional a su peso molecular (Benavides *et al.* 2006). Una vez que los hidrocarburos se encuentran en los ecosistemas y se concentran en las cadenas tróficas, provocan afectaciones celulares y sistémicas en los organismos y, por tanto, pueden generar respuestas demográficas como cambios en el tamaño y crecimiento de las poblaciones de aquellas especies más vulnerables y/o susceptibles. Ejemplo de estas afectaciones se evidencia en los mamíferos marinos, los cuales al ingerir grandes cantidades de hidrocarburos sufren daños en su tracto respiratorio y la mucosa digestiva por efecto de estos contaminantes, los cuales les pueden ocasionar su muerte (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2007).

La contaminación de las aguas por hidrocarburos es una consecuencia generada, principalmente, por la actividad del hombre, siendo motivo de preocupación la velocidad con la que a diario se deterioran los ecosistemas acuáticos debido a la contaminación generada por el aumento de las actividades antropogénicas en las últimas décadas (Gupta *et al.* 2015). La generación de residuos inorgánicos y orgánicos (Stauffer 2013) por parte de las industrias como la petroquímica, la farmacéutica, de insecticidas y fertilizantes, entre otras, han ocasionado uno de los problemas más serios en materia de contaminación, donde los hidrocarburos (Martínez-Prado *et al.* 2011), juntos a otros contaminantes, como por ejemplo los compuestos farmacéuticos (Escobar 2002; Kraemer *et al.* 2001), se encuentran entre los problemáticos.

La estructura y propiedades químicas de los hidrocarburos definen su toxicidad. Los HPAs y los asfaltenos constituyen los hidrocarburos de mayor peso molecular y complejidad química. En particular, los HPAs han sido extensamente estudiados debido a sus propiedades químicas, toxicológicas y de biodegradación, las cuales los definen como un grupo de contaminantes ambientales estables y persistentes, que se consideran xenobióticos, con bajas tasas de biodegradación microbiana.

1.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos se caracterizan por ser estructuras formadas por dos o más moléculas fusionadas de benceno. Son sustancias lipófilas, volátiles, persistentes en los ecosistemas y los procesos de fotooxidación ocasionan una inestabilidad fotoquímicamente en los mismos; la cual se acentúa con el aumento de su masa molecular (Clar, 1964; Patnaik, 1999). Presentan características generales como, altos puntos de fusión y ebullición y baja solubilidad en agua. Estudios realizados por Velasco y Sepúlveda en 2003, demuestran que el aumento en el número de los anillos de benceno unidos disminuye la solubilidad y aumenta la hidrofobicidad (Wilson & Jones 1993). La estructura tridimensional de los HPAs se describe como un sistema de enlaces π circular. Los electrones π son móviles y circulan en el plano del anillo de tal manera que la densidad de electrones está uniformemente distribuida en los planos ubicados por encima y por debajo del anillo (deslocalización) (Figura 2).

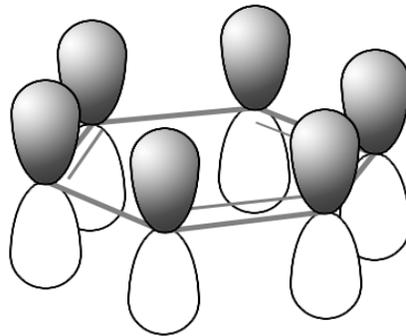
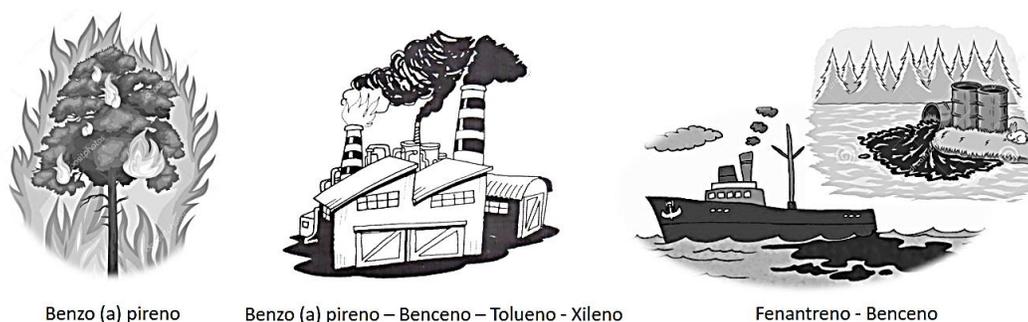


Figura 2. Estructura tridimensional del benceno con enlaces π por encima y por debajo del anillo.

Esta propiedad les confiere una mejor estabilidad química y hace que la estructura de la molécula sea diferente a la estructura de moléculas no aromáticas, aunque similares. Es por esta razón que los compuestos aromáticos tienden a mantener su estructura electrónica y conformación, debido a que sufren de reacciones de sustitución aromática pero no de adición electrofílica (Jakszyn *et al.*, 2006; Agudo A, 2010; Schmidt *et al.*, 2010).

Los HPAs pueden generarse a partir de fuentes naturales como los incendios forestales (Ejemplo: benzo (a) pireno (BaP)) y/o a partir de fuentes antropogénicas como la quema de combustibles fósiles, madera, basura, la incineración de residuos sólidos municipales (Ejemplos: benzo (a) pireno, benceno, tolueno, xileno) y los derrames de petróleo (Ejemplos:

fenantreno (Fen), benceno) (Kaushik y Haritash, 2006) (Figura 3). La descomposición térmica de moléculas orgánicas, la combustión incompleta a altas temperaturas (500–800 °C) o la sujeción de material orgánico a bajas temperaturas (100–300 °C) por largos períodos de tiempo son otras de las fuentes que generan HPAs (Patnaik, 1999). Generalmente, el contenido de BaP es mayor y alcanza valores máximos en el aire situado en la parte superior de los hornos en fábricas de electrodos de grafito, plantas de aluminio y fundiciones, entre otras. El aire situado en la parte superior de los canales de humos y del precipitado de alquitrán es extremadamente rico en este compuesto como se mencionó anteriormente, con concentraciones de hasta 500 mg/m³ de BaP (Mastandrea *et al.*, 2005).



Benzo (a) pireno

Benzo (a) pireno – Benceno – Tolueno - Xileno

Fenantreno - Benceno

Figura 3. Ejemplos de fuentes que generan HPAs.

Los HPAs son carcinógenos y mutágenos (Petit *et al.*, 2013; Yang *et al.* 2015; Long *et al.* 2016; Madeen *et al.* 2016), en particular los compuestos de cinco y seis anillos de benceno unidos (IARC, International Agency for Research on Cancer y la IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2010).

Estudios en mamíferos han demostrado que la ingesta de HPAs está favorecida por la alta solubilidad lipídica que presenta el tracto gastrointestinal de estos animales (Heitkamp *et al.* 1988). A mayor número de anillos de benceno, mayor será la toxicidad de los HPAs debido a su alto peso molecular (Cerniglia 1992; Gupta *et al.* 2015). Los HPAs provocan carcinogenicidad al entrar en contacto con el organismo, lo cual ocasiona que la actividad metabólica iniciada forme aductos entre los HPAs y el ADN (Who, 2010; Shemer *et al.*, 2007), ocasionando mutaciones en genes críticos como el p53 (gen supresor de tumores) finalizando con la ocurrencia de mutaciones (Krewski *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 2000). Estudios en animales muestran afectaciones en una gran variedad de tejidos, como los pulmones, la piel, el hígado y el riñón ocasionadas por la exposición a HPAs (Dasenbrock *et al.* 1996). También se han realizado estudios de medición de los niveles

de HPAs en muestras pulmonares extraídas en autopsias de fumadores y no fumadores, en los cuales se ha evidenciado la formación de epóxido de bapiridiol resultante de la bioactivación metabólica del BaP mediante citocromos P450 1A1. El epóxido de bapiridiol obtenido se une al ADN para formar bapiperidiol-epóxido-ADN, cuyo nivel se puede utilizar como biomarcador para evaluar la exposición de los seres humanos al BaP (Lodovici *et al.* 1998; Vázquez Gómez *et al.*, 2016).

Los HPAs también se caracterizan por ser disruptores endócrinos, a pesar de que los estrógenos endógenos presentan mayor potencialidad que éstos. Hasta el momento, no ha sido dilucidado si los humanos reciben un efecto estrogénico neto ante la presencia de HPAs (Liehr JG, 2000). Sin embargo, sí se conoce que compuestos químicos como los pesticidas, dioxinas, furanos y bifenilos policlorados, presentan actividad estrogénica *in vitro*. Alteraciones causadas en el funcionamiento normal de las hormonas esteroideas naturales, promueven o interfieren en las modificaciones de estas hormonas. Alteraciones en el número de receptores y se predisponen estos tejidos a posteriores respuestas anormales. Numerosos estudios han asociado diversas patologías observadas en distintas especies animales con la exposición a disruptores endócrinos. Entre los estudios podemos evidenciar las alteraciones de la función tiroidea en aves y peces; la disminución de la fecundidad en aves, peces, moluscos y mamíferos; la disminución de la eficacia en el proceso de incubación en peces, aves y tortugas; la desmasculinización y feminización de los machos en peces, aves y mamíferos; la desfeminización y masculinización de las hembras en peces, gasterópodos y aves; y alteraciones del sistema inmune en aves y mamíferos (Sherigan García, 2014).

La actividad genotóxica de los HPAs está relacionada con el aumento de su peso molecular, ya que al presentar mayor número de anillos de benceno, se dificulta el proceso de ruptura de los mismos en los organismos. Las características genotóxicas una vez que han sido transformados los HPAs, se manifiestan en intermediarios capaces de unirse covalentemente al ADN (Hussein *and* Mona, 2016). La oxidación de estos HPAs como se mencionó anteriormente origina los epóxidos (Esra, 2016). Entre los HPAs más peligrosos destacan los derivados de antraceno, como el benzo (a) pireno y dibenzeno (a, h) antraceno (Vives *et al.*, 2001). La estructura del benzo (a) pireno presenta una región en su estructura con capacidad de captar electrones, lo que le permite con moléculas complejas como el ADN. El BaP es de los HPAs

más estudiado en modelos de experimentación. Produce tumores en diferentes tejidos, dependiendo de las especies sometidas en los ensayo y la vía de aplicación. En el BaP ha sido probada su carcinogenicidad por inhalación, produciendo tumores pulmonares en el hamster chino (*Cricetulus griseus*) y en ratas (*Sprague Dawley*) (Monroy *et al.*, 2005; ATSDR, 2012). Existen también estudios realizados con la microalga marina *Dunaliella tertiolecta* para determinar el daño genotóxico provocado ante la exposición a diferentes concentraciones de BaP (1.0, 3.2 y 3.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), observándose conglomerados de moléculas de ADN (Montoya, 2011).

Los HPAs presentes en el ambiente están propensos a procesos como volatilización, fotooxidación, oxidación química, adsorción por partículas del suelo y degradación fúngica y microbiana en general (Hussein y Mona, 2016) (Figura 4). En la actualidad se han identificado aproximadamente 100 HPAs potencialmente cancerígenos (National Toxicological Program (NTP), 2002). El Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud de conjunto con expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2005) y el Grupo de Expertos de Contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) han determinado que 16 de estos 100 HPAs son indiscutiblemente genotóxicos y carcinógenos para el ser humano (Pelkonen y Nebert, 1982; Habe y Omori 2003). Estos hidrocarburos son clasificados como HPAs de alto peso molecular, los cuales se caracterizan por presentar dos o más anillos de benceno unidos, que pueden ser absorbidos por el suelo y los sedimentos (fluoreno, fenantreno y antraceno y derivados), propiedad que los define como compuestos recalcitrantes para el ambiente con limitadas potencialidades de biotransformación (Bisht *et al.*, 2015).

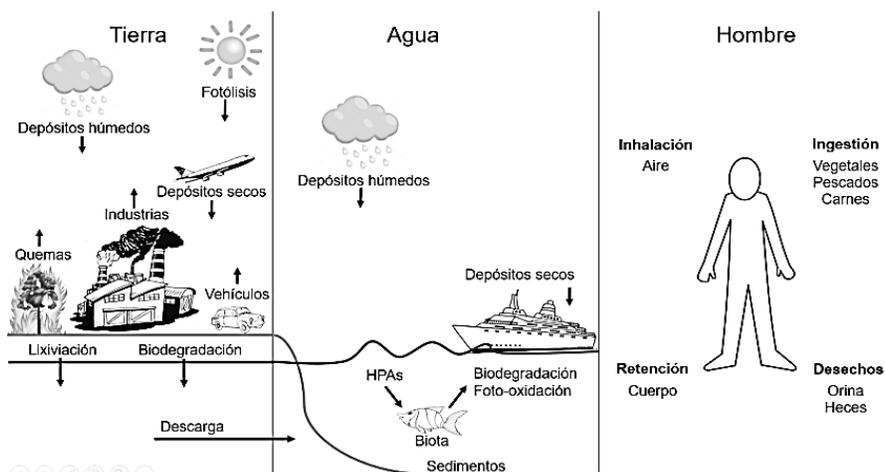
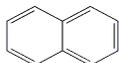
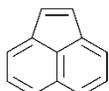
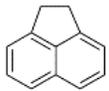
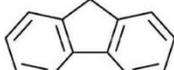
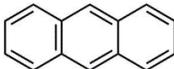
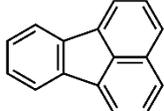
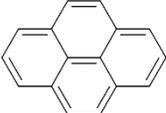
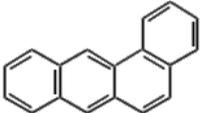
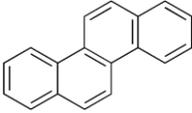
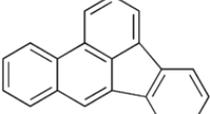
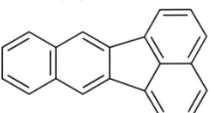
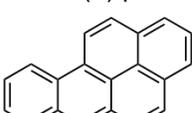
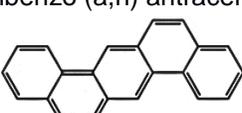
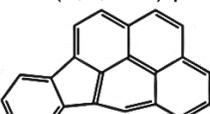
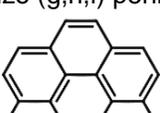


Figura 4. Movilidad de los HPAs en el ambiente.

En la Tabla 1 podemos encontrar algunas de las características fisicoquímicas de los 16 HPAs clasificados como prioritarios. Estudios realizados han indicado que los compuestos de uno, dos y tres anillos aromáticos son tóxicos agudos (Sims *et al.* 1983). Muchos de los HPAs son caracterizados como carcinógenos, por lo que es importante el estudio de los mismos como contaminantes ambientales (Yang *et al.* 2015; Long *et al.* 2016; Madeen *et al.* 2016).

Tabla 1. Propiedades de los 16 HPAs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la US-EPA.

Compuestos	Nº de anillos aromáticos	Peso molecular	Solubilidad en agua (mg/L)	Factor carcinogénico
Naftaleno 	2	128	31.7	0.001
Acenaftileno 	3	152	16.1	0.001
Acenafteno 	3	154	3.9	0.001
Fluoreno 	3	166	1.8	0.001
Fenantreno 	3	178	1.3	0.001
Antraceno 	3	178	0.07	0.01
Flouranteno 	4	202	0.26	0.001
Pireno 	4	202	0.14	0.001

				
Benzo (a) antraceno 	4	228	0.002	0.1
Criseno 	4	228	0.0006	0.01
Benzo (b) flourantreno 	5	252	0.0012	0.1
Benzo (κ) flourantreno 	5	252	0.00055	0.1
Benzo (α) pireno 	5	252	0.0033	1
Dibenzo (a,h) antraceno 	6	278	0.0005	5
Indeno (1,2,3 cd) pireno 	6	276	0.062	0.1
Benzo (g,h,i) perileno 	6	276	0.00026	0.01

Entre los HPAs de alto peso molecular encontramos el benzo (a) pireno (BaP). Éste ha sido clasificado por la EPA como un contaminante prioritario, clasificación basada en su carcinogenicidad (Tabla 1) y toxicidad aguda. Estudios realizados con BaP en ratones hembras Balb/c han demostrado la carcinogenicidad de este HPA, evidenciándose afectaciones durante el

embarazo como: dificultades para reproducirse, defectos de nacimiento y peso corporal disminuido (Alfonso Díaz, 2016). Los niveles de BaP presentes en el medio ambiente son considerados a la hora de elaborar regulaciones de evaluación ambiental y saneamiento a nivel internacional (Juhasz and Naidu 2000). Oteropaternina y colaboradores en el 2013, demostraron que la microalga *Chorella vulgaris* disminuye la producción de clorofila, al ser expuestas a concentraciones de fenantreno mayores a 1 µg/L, una concentración cercana a la detectada en aguas residuales asociadas a la extracción petrolera (entre 1,1 y 9,3 µg/L) (Gordillo *et al.*, 2006).

Existen organismos capaces de degradar HPAs de bajo peso molecular, sin embargo, muy pocos son los géneros microbianos que han demostrado tener capacidad de degradar HPAs de alto peso molecular, como es el caso del BaP (Juhasz and Naidu 2000). Históricamente, tanto el benzo (a) pireno como el fenantreno se han utilizado ampliamente como HPAs modelos para los estudios de biodegradación y toxicidad a nivel de laboratorio. Una vez que el benzo (a) pireno y el fenantreno se encuentran en los ecosistemas acuáticos mediante procesos como evaporación, disolución, dispersión, emulsificación, fotooxidación y degradación microbiana, estos HPAs pueden moverse a otros ecosistemas. Para el caso del benzo (a) pireno y fenantreno específicamente presente en las columnas de agua, la sedimentación constituye el mecanismo de remoción primario (Cerniglia, 1992), lo cual provoca su acumulación en determinadas superficies favoreciendo de este modo su permanencia por largos períodos de tiempo.

1.3. Fenantreno y benzo (a) pireno

El benzo (a) pireno y el fenantreno han sido ampliamente estudiados debido a la presencia de ambos en diferentes ecosistemas. En ambientes contaminados éstos se encuentran en concentraciones elevadas, resultando de gran importancia su monitoreo, ya que debido a sus propiedades fisicoquímicas es que se encuentran en concentraciones elevadas. El BaP se ha encontrado en el aire en concentraciones de 0.1 ng/m³ y en la atmósfera urbana contaminada, llega a alcanzar valores de miles de veces superiores (Mastandrea *et al.*, 2005). El fenantreno

predomina entre los HPAs aislados de las muestras de aire tomadas en industrias del gas y del coque, incluso en las instalaciones modernas.

El fenantreno (Fen) es considerado junto con el fluoranteno y benzo (a) pireno entre los principales hidrocarburos que ocasionan contaminación atmosférica porque puede constituir hasta el 49% de los HPAs presentes en el ambiente (Orliski, 2002; Shimada *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005 y Nizetto *et al.*, 2008). El fenantreno se compone por tres anillos aromáticos unidos de benceno y se clasifica como un HPA de bajo peso molecular. Se emplea frecuentemente como HPA modelo para estudiar los efectos carcinogénicos en diferentes sistemas (Pelkonen y Nebert, 1982; Narro *et al.*, 1992; Yang *et al.* 2015; Long *et al.* 2016; Madeen *et al.* 2016). Estudios realizados por Stephen S. Hecht en 2011, mencionan que el fenantreno es uno de los 18 HPAs presentes en el humo del tabaco, este provoca mutaciones en el ADN. Adicionalmente se ha utilizado el fenantreno para estudiar su efecto potencial sobre poblaciones microbianas. Este HPA induce cambios en la cromatina y es considerado un potente inhibidor de la comunicación intracelular y la respiración mitocondrial (Weis *et al.*, 1998) en organismos como primates, roedores neonatales, humanos y ratas (Pariante y Lightman, 2008).

Resultados obtenidos en monitoreos de calidad de las aguas, en la región de la Orinoquia colombiana utilizadas en los procesos de extracción de hidrocarburos, indican que los niveles de fenantreno pueden llegar hasta 134 µg/L en el agua residual asociada a la producción. Una vez que estas aguas son sometidas a los tratamientos establecidos en las industrias petroleras, estas concentraciones de fenantreno bajan a valores no detectables (<0,22 µg/L), aunque en ocasiones se han reportado concentraciones cercanas a 7 µg/L (Otero-Paternina *et al.*, 2013). Cabe destacar entonces, la importancia de mejorar los procesos para la eliminación de HPAs en los desechos de las aguas residuales de las industrias. El uso combinado de métodos biológicos con fisicoquímicos resulta importante en la actualidad, obteniéndose de este modo una estrategia robusta para la eliminación de compuestos recalcitrantes como es el caso de los xenobióticos.

Por su parte, el benzo (a) pireno (BaP) es un HPA de alto peso molecular compuesto por cinco anillos unidos de benceno. La persistencia en el ambiente de este HPA es de gran importancia ambiental (National Toxicological Program (NTP), 2002) debido a las características que presenta el mismo y la bioacumulación en los diferentes ecosistemas como es el caso de suelos, aguas y aire (McElroy *et al.*, 1989). Referente a los efectos mutagénicos

y carcinogénicos de este HPA, se ha demostrado la inducción de aberraciones microsomales en peces cebras, así como hiperplasia y neoplasia epidermal, provocando afectaciones en la biota presente en los ecosistemas acuáticos (Montoya, 2011).

El BaP es el HPA más estudiado, debido a que es representativo de los efectos causados por los HPAs de alto peso molecular. Este hidrocarburo se encuentra presente en asfaltos y forma parte de los gases de escape de los automóviles, humo de tabaco, aceites minerales, aceites usados de motor y de equipos dieléctricos. Es un compuesto altamente soluble en solventes apolares como benceno, tolueno, xileno, ciclohexano y éter, pero poco soluble en etanol, metanol y casi insoluble en agua (0.1 g/100 mL) (Schmidt *et al.*, 2010). Cerniglia y colaboradores en 1986, evidenciaron su estabilidad relativa, sin embargo tanto la luz como el oxígeno ambiental lo pueden descomponer. Estudios realizados con BaP en la rizosfera vegetal de leguminosa guaje (*Leucaena leucocephala*), han demostrado la acumulación de este HPA en las raíces de las plantas modificando sus exudados y la población de microorganismos presentes en su rizosfera (Reilley *et al* 1996; Binet *et al* 2000; Rivera-Cruz 2001).

El BaP es liposoluble, lo que no solamente facilita su adherencia a la grasa de los alimentos, sino también favorece su difusión y transporte a través de las membranas celulares de animales y específicamente de los mamíferos. Cuando se ingiere con los alimentos se absorbe en el intestino, pero también puede ingresar al organismo por fuentes no alimenticias, por ejemplo, por medio de los pulmones al ser inhalado, debido a que el compuesto en mención es altamente volátil o por vía cutánea. Su insolubilidad en agua provoca que los lípidos formen micelas con sales biliares para su digestión intestinal y posterior absorción de los productos de la misma (Henkjan, 2001), ya que la mayoría de los compuestos hidrofóbicos que ingresan al tracto gastrointestinal no pueden disolverse en el medio acuoso. Algunos factores involucrados en los procesos de digestión y absorción de los lípidos de la dieta, tales como la presencia de sales biliares, también afectan la absorción de los HPAs (Who, 2010).

1.4. Compuestos farmacéuticos

Los compuestos farmacéuticos (PhCo) son sustancias químicas sintéticas o naturales que constituyen los núcleos bioactivos de las formulaciones de los medicamentos. Son un grupo de sustancias muy heterogéneo cuyos principios activos son diseñados para provocar efectos farmacológicos inmediatos, tempranos, tardíos, acumulativos y de largo plazo, entre otros. Los medicamentos se han convertido desde décadas en productos imprescindibles debido a los beneficios significativos que reportan para la sociedad. Sin embargo, se consideran contaminantes o xenobióticos emergentes del siglo XXI. La presencia de éstos en cuerpos de aguas potables aumenta la importancia del estudio de los mismos según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La liberación de PhCo a ambientes acuáticos se produce a través de varias vías, entre las que podemos mencionar: vertimiento de aguas residuales domésticas, descargas hospitalarias, disposición inapropiada de los fabricantes, plantas de tratamiento de aguas residuales y plantas de tratamiento de agua municipales. En comparación con las aguas residuales domésticas, los efluentes hospitalarios generalmente presentan mayores frecuencias de detección y concentraciones de productos farmacéuticos (Kosma *et al.* 2010 y Yang *et al.* 2017).

Los PhCo son generalmente absorbidos por los seres vivos una vez ingeridos; posteriormente son degradados metabólicamente. Sin embargo, las fracciones significativas de las sustancias originales a menudo se excretan a través de la orina o las heces en las aguas residuales crudas, que pueden o no ser tratadas (Quesada *et al.*, 2009). Los PhCo pueden clasificarse en diferentes grupos de acuerdo con sus propiedades y propósitos, entre los que podemos encontrar antibióticos, hormonas, analgésicos, antiinflamatorios, reguladores de lípidos en sangre, β -bloqueantes y fármacos citostáticos (Figura 5) (Yang *et al.* 2017), dentro de los cuales existen medicamentos que son de uso frecuente como la penicilina, la estrona, y el ibuprofeno, entre otros (Quesada *et al.*, 2009 y Yang *et al.* 2017).

ANTINFLAMATORIOS ANALGÉSICOS		REGULADORES LIPÍDICOS		B-BLOQUEADORES
aspirina	indometacina	gemfibrozil		atenolol
diclofenaco	naproxeno	benzafibrato		propranolol
ibuprofeno	fenazona	ácido clofibrato		metoprolol
paracetamol	codeína	fenofibrato		nadolol
				sotalol
				betaxolol
AGENTES CITOSTÁTICOS		ANTIBIÓTICOS		ESTEROIDES HORMONAS
ciflofosfamida		penicilina	sulfametoxazol	
ifosfamida		eritromicina	flumequina	17β-estradiol
		ofloxacino	ciprofloxacina	estrona
DIURÉTICOS		clortetraciclina	trimetoprima	17α-etinilestradiol
furosemida		oxitetraciclina	amoxicilina	dietiltilbestrol
		estreptomina	lincomicina	acetato de dietiltilbestrol
ANTIÉPILÉPTICOS				
carbamazepina				
SEDATIVOS				
diazepam				

Figura 5. Compuestos farmacéuticos más frecuentes encontrados en el medio ambiente (Quesada *et al.*, 2009).

Es de vital importancia el estudio de los compuestos antiinflamatorios no esteroideos, debido a la abundancia en aguas residuales de los mismos (Verlicchi *et al.*, 2012). Estos PhCo son bloqueadores de las enzimas ciclooxigenasas (COX) que catalizan la síntesis de diferentes prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Entre los antiinflamatorios tradicionales, los más ampliamente utilizados en Europa son el ibuprofeno, el naproxeno y el diclofenaco. El ibuprofeno también es uno de los diez medicamentos más vendidos a nivel mundial (Khetan y Collins, 2007).

El 30% de los medicamentos son diseñados para mantener su estructura química durante largos períodos de tiempo, escapando de esta manera de la degradación en las plantas de tratamiento de residuos e incorporándose al medio ambiente. Los seres vivos excretan medicamentos al no ser metabolizados completamente en el organismo, juntamente con el vertimiento de medicamentos caducados, se consideran las causas que explican la presencia de PhCo en las columnas de agua (Khetan y Collins 2007). Los PhCo excretados pueden conservar sus concentraciones y estructuras originales o transformarse en otros compuestos activos (o inactivos) durante su vida útil en ecosistemas acuáticos. Los PhCo se encuentran en concentraciones de partes por billón (ng/L) en aguas superficiales, subterráneas, agua potable y de alcantarillado (Yang *et al.* 2017).

Los medicamentos altamente liposolubles pueden además acumularse en el tejido adiposo de los animales y pasar así a la cadena alimenticia. Estos productos se degradan al ser digeridos y metabolizados por los organismos, o bien a través de procesos fisicoquímicos en el suelo y el agua (Quesada *et al.*, 2009 y Jean-Michel Pépin, 2006). Estudios de Oaks y colaboradores en 2014, reportaron la muerte de miles de especies de buitres en el Subcontinente indio. La causa de muerte de estas aves necrófagas fue debido al envenenamiento por la presencia de diclofenaco en los cadáveres de los ganados bovinos y porcinos, debido a que éstos habían sido tratados con dicho antiinflamatorio poco antes de su muerte. Este antiinflamatorio no esteroideo es utilizado por los veterinarios para el tratamiento de inflamación, dolor y fiebre en ganado doméstico, y también es utilizado frecuentemente en humanos para tratar los mismos síntomas (Batlouni, 2009).

En la actualidad, la presencia de compuestos farmacéuticos en columnas de aguas potables es considerada inferior a las dosis terapéuticas mínimas. Sin embargo, la combinación de varios de estos compuestos resulta importante estudiarla. Las características que presentan los PhCo, como su elevada actividad biológica y persistencia en los ecosistemas, provoca disímiles afectaciones en los diferentes ecosistemas (Quiroga-Alonso *et al.*, 2015). En México no existen legislaciones publicadas que establezcan los límites máximos permisibles ante la presencia de PhCo en aguas, por lo que es de vital importancia realizar estudios que describan estos valores.

La presencia de antibióticos ha sido frecuentemente encontrada en aguas potables, pero la información disponible sobre toxicidad ecológica está limitada a los efectos letales agudos. La toxicidad aguda de estos para organismos acuáticos tales como bacterias, invertebrados y peces se presenta ante concentraciones en el orden de los mg/mL (Ji *et al.*, 2012).

La existencia de efectos negativos sobre animales que se encuentran en contacto con los medicamentos presentes en las columnas de aguas se evidencia, por ejemplo, con la aparición de feminización de los peces machos (*Mugil cephalus*) que entran en contacto prologando con el etilestradiol (principio activo de las píldoras anticonceptivas), causando una disminución importante en la reproducción de las especies afectadas (Moreno-Ortiz *et al.*, 2013). Todos los estudios realizados sobre hormonas y esteroides en flora y especialmente fauna que están en contacto continuo con estos residuos de medicamentos demuestran dos efectos principales. Primeramente, que si los animales tienen un receptor para la hormona a la cual son sometidos, se presenta un efecto exacerbado de la hormona, provocando cambios significativos sobre el

especímen en cuestión. Y como segundo efecto tenemos que si las especies no poseen receptores específicos pueden presentar efectos secundarios negativos (Lai *et al.*, 2002).

Existe una relación directa entre la resistencia de los microorganismos y los antibióticos presentes en el agua, demostrado a través de la frecuencia de transferencia de plásmidos que confieren resistencia a oxitetraciclina en bacterias presentes en efluentes cercanos a hospitales. Se determinó que la mayoría de estas bacterias estudiadas, principalmente *Aeromonas* sp., tenían el plásmido de resistencia a oxitetraciclina y lo transferían a cepas de *E. coli* aislada de humanos cuando se encontraban en presencia del agua obtenida del efluente cercano al hospital, demostrándose una relación directa entre el agua obtenida y la transferencia del plásmido de resistencia (Rhodes *et al.*, 2000).

1.5. Aguas contaminadas por HPAs y compuestos farmacéuticos

Compuestos manufacturados o de origen natural como fármacos, surfactantes, retardantes, plastificantes, esteroides y otros compuestos orgánicos que son sintetizados, usados y dispuestos por la sociedad moderna son ahora reconocidos como contaminantes ambientales. Muchos de los ambientes contaminados por HPAs, como los sitios de extracción de petróleo y las aguas residuales de la industria petroquímica, se caracterizan por ser salados o hipersalinos (concentraciones de NaCl por encima de los 0.5 M) (Gousmi *et al.*, 2016). Tal es el caso de los derrames de petróleo en el mar, donde la concentración de NaCl alcanza valores de 0.5 M en adelante o en aguas residuales de las industrias, las cuáles utilizan aguas saladas en sus procesos y vierten una vez terminados los mismos, altas concentraciones de sal en sus aguas residuales ($\approx 10,000$ mg/L) (Veerasingam *et al.*, 2014). Estas altas concentraciones de NaCl constituyen un reto adicional para las estrategias de biorremediación en las mismas.

Adicionalmente, la presencia de fármacos en aguas residuales es uno de los retos actuales en el control medioambiental. Forman parte de los denominados contaminantes emergentes y se encuentran muy extendidos en ríos y lagos, ya que se dispersan a través de las aguas residuales domésticas, hospitalarias e industriales. Durante los últimos años, se han identificado en las columnas de agua potable numerosos compuestos farmacéuticos, entre

ellos cabe destacar los que se consideran entre los más vendidos a nivel mundial: acetaminofen, cotinina, ibuprofeno, entre otros (Yang *et al.* 2017).

En la actualidad muchos de los compartimentos del medio ambiente, como suelos, columnas de aguas saladas y dulces y el aire, presentan múltiples trazas de contaminantes orgánicos, entre los que podemos mencionar a los productos farmacéuticos como hormonas esteroideas y antibióticos (17 β estradiol y Amoxicilina respectivamente) y pesticidas como Benomyl y Permetrina. Estos contaminantes disminuyen considerablemente la biota presente en estos ecosistemas (Repetto *et al.*, 1996; Haroune *et al.* 2016; Schaider *et al.* 2014). La industria farmacéutica elabora medicamentos con elevada biodisponibilidad y resistencia a la degradación. Ejemplo de éstos podemos mencionar a la cefalosporina, reconocida en el grupo de los antibióticos de tercera generación o amplio espectro. Los fármacos muestran elevada persistencia en los ambientes acuáticos y existen reportes de la aparición en moluscos bivalvos (mejillones y ostras) y peces hermafroditas debido a la exposición con estos PhCo, como es el caso de las hormonas esteroideas (Khetan y Collins 2007; Irwing *et al.*, 2015).

Los países industrializados han logrado controlar la contaminación de aguas industriales, sin embargo, muchos efluentes continúan deteriorando la calidad de los ecosistemas acuáticos e interfieren en el uso de éstos. Estos efluentes deben de ser tratados antes de su vertimiento a las masas de aguas, con el objetivo de modificar sus condiciones físicas, químicas y microbiológicas (Gousmi *et al.*, 2016).

1.6. Métodos biológicos para el tratamiento de aguas contaminadas

Los procesos evolutivos y las estrategias de adaptación han provocado que existan organismos capaces de metabolizar xenobióticos mediante la utilización de un conjunto de enzimas, como es el caso de las ligninas peroxidasas, manganeso peroxidasas, lacasas, hidrolasas en general, y proteínas de membrana como los citocromos P450, entre otras. Debido a que distintos organismos cuentan con una batería de enzimas para degradar compuestos como la lignocelulosa, cuyos componentes presentan estructuras similares a distintos xenobióticos, esto les ha permitido su degradación. Basado en las potencialidades

que presentan los organismos vivos para remover contaminantes en diversos ecosistemas, surge el concepto de biorremediación, el que se considera como el conjunto de metodologías o herramientas basadas en el uso de organismos o sus bioproductos para la remoción y/o la degradación parcial o total de xenobióticos presentes en el medio ambiente (Karimi y Hassanshahian, 2016).

El uso en ambientes contaminados de organismos exógenos, endógenos, o la combinación de ambos, permite realizar los procesos de biorremediación (Cerniglia, 1992; Providenti *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 2003). Estos métodos pueden desarrollarse en condiciones aerobias, anaeróbicas o anóxicas, en dependencia del organismo a utilizar y de las características del ecosistema en particular (N. Balagurusamy, 2005). Entre las variables que se requieren controlar en estos procesos podemos mencionar: la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, las concentraciones de micro y macro nutrientes, la disponibilidad de agua y la presencia de inhibidores de reacciones biológicas (Balcázar-López *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta todos los aspectos mencionados anteriormente, cabe destacar el uso de organismos como plantas (fitorremediación) y microorganismos como hongos y bacterias, para poner en práctica los procesos de biorremediación. La utilización de un organismo u otro depende de las características del ambiente a biorremediar (Haritash *and* Kaushik, 2009). Se ha reportado el uso de distintas especies de plantas (*Zea mays L.*, *Paspalum virgatum L.*, *Sorghum vulgare L.*, *Phaseolus vulgaris L.*, *Phaseolus coccineus L.*, *Hordeum vulgare L.*, entre otras) en la fitorremediación de ambientes contaminados con HPAs (Marín y Ordaz, 2013).

Los géneros *Penicillium*, *Trichoderma*, o *Aspergillus* han sido caracterizados como degradadores de petróleo crudo y de BaP, tanto en medios de cultivo líquidos como en la rizosfera de plantas crecidas en ambientes contaminados (Pernía *et al.*, 2012). El uso de microorganismos para realizar los procesos de biorremediación prevalece sobre los procesos de fitorremediación, debido a su fácil manejo, disminución del tiempo de tratamiento, metabolismo, y productos secundarios, entre otros. Es de resaltar que los microorganismos que habitan en ambientes contaminados son capaces de utilizar los contaminantes como fuente de energía, debido a su adaptabilidad genética (Gupta *et al.* 2015). Presentan la capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos aromáticos y transformarlos en intermediarios centrales clave tales como el catecol, protocatequilo y benzoil-CoA. Posteriormente se dividen los anillos aromáticos y se convierten los intermediarios

en metabolitos intermedios tales como acetil-CoA, succinil-CoA y piruvato, que pueden ser usados para el crecimiento microbiano (Fuchs *et al.* 2011).

1.7. Microorganismos degradadores de HPAs y compuestos farmacéuticos

Los microorganismos metabolizan xenobióticos mediante la oxidación y mineralización de los sustratos (Aranda, 2016). Los hongos filamentosos presentan ciertas ventajas sobre las bacterias en el ámbito de la biorremediación. Éstos tienen la capacidad de contar con una alta proliferación tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, y pueden adaptarse y colonizar diversos ecosistemas rápidamente, incluso en ambientes que pueden llegar a ser tóxicos para otras especies. El pH, la concentración de biomasa y las características de los contaminantes presentes en estos ambientes, son las condiciones fundamentales de las cuales depende el mecanismo de degradación realizado por los hongos (Abraham y García, 2015). Estudios realizados demuestran que los hongos son capaces de oxidar BaP mediante mecanismos similares a los observados en los mamíferos (Mastandrea *et al.*, 2005). Este mecanismo está mediado por mono-oxigenasas microsomales del citocromo P-450, en el que ocurre la oxidación fúngica de BaP dando como resultado la formación de transdihidrodiol, lo que apoya la hipótesis de que la oxidación de BaP fúngica está mediada por el citocromo P-450 (Heitkamp *et al.* 1988).

Existen estudios que señalan a los citocromos (Cyt) P450 como las primeras enzimas en activarse al ponerse en contacto con ambientes contaminados con xenobióticos. También podemos encontrar las enzimas intra y extracelulares, las cuales se activan ante las mismas condiciones, pero cabe destacar una vez más su baja especificidad de sustrato, lo cual es de vital importancia para poder degradar diferentes sustratos (Aranda, 2016).

Los mecanismos extracelulares presentes en hongos de la pudrición blanca de la madera (Basidiomicetos) están ampliamente estudiados y se ha demostrado que el mecanismo oxidativo de enzimas ligninolíticas (manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa), cataliza la degradación de gran cantidad de xenobióticos incluyendo HPAs (Hammel *et al.*, 1986; Christian *et al.*, 2005; Quintero Díaz, 2011). El basidiomiceto más estudiado para los procesos de degradación de compuestos aromáticos tóxicos es *Phanerochaete chrysosporium*; además de

Trametes versicolor, *Pleurotus ostreatus*, *Tyromyces palustris*, *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Bjerkandera* sp., *Phlebia radiata*, y *Ceriporiopsis subvermispora* entre otros (Quintero Díaz, 2011). Entre las enzimas reportadas para llevar a cabo estos procesos de degradación podemos mencionar a las peroxidasas como la lignino y manganeso peroxidasa (LiP y MnP) y las lacasas.

Trabajos realizados indican que los basidiomicetos pueden degradar una amplia variedad de contaminantes ambientales (Bumpus *et al.*, 1985; Quintero Díaz, 2011). Entre las ventajas que presentan estos hongos, encontramos la tolerancia a concentraciones altas de contaminantes y su capacidad para crecer a bajos valores de pH. Además, gracias a la extensión de sus hifas, estos pueden alcanzar contaminantes en el suelo, que no son biodisponibles ni biodegradables para otros organismos, y dado que requieren de sustratos lignocelulósicos para su crecimiento, es posible adicionar a los sitios contaminados, residuos de muy bajo costo como viruta de madera, carozo de maíz o paja de trigo, para promover su crecimiento e incrementar la degradación de los contaminantes (Aust y Benson, 1993; Barr y Aust, 1994; Quintero Díaz, 2011). El “sistema de degradación de lignina” (SDL) es el sistema catabólico inicial de la degradación de xenobióticos utilizado por estos hongos. La acción de este sistema es estrictamente extracelular y en él intervienen un grupo de hemoproteínas extracelulares denominadas enzimas peroxidasas, conocidas como lignino peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnP), un grupo de enzimas productoras de H₂O₂, un grupo de oxidasas (lacasas), manganeso y ácidos orgánicos como oxálico o malónico, entre otras (Quintero Díaz, 2011).

La enzima lacasa cataliza la oxidación de sustratos fenólicos y otros sustratos como antraceno y BaP (Collins *et al.*, 1996). En el Tabla 2 se presentan algunos compuestos que son degradados por las enzimas ligninolíticas.

Tabla 2. Algunos compuestos orgánicos degradados por enzimas ligninolíticas (Quintero

Díaz, 2011).

Compuestos	Enzima	Referencia
Tinte Azul de metileno Tinte Poly R-478 Benzo (a) pireno	LiP+ AV MnP + Mn ²⁺ MnP + Mn ²⁺	(Ferreira <i>et al.</i> , 2000) (Moreira <i>et al.</i> , 2001) (Sack <i>et al.</i> , 1997)
Antraceno	Lacasa LiP+ AV MnP + Mn ²⁺	(Vázquez <i>et al.</i> , 1994) (Field <i>et al.</i> , 1996) (Field <i>et al.</i> , 1996)
Cloro-hidroxibifenilos Diclorometano	Lacasa LiP + AV	(Nyholm <i>et al.</i> , 1992) (Khindaria <i>et al.</i> , 1995)

LiP: Lignino peroxidasa; **AV:** Alcohol veratrílico; **MnP:** Manganese peroxidasa

Estudios realizados mencionan la presencia de diferentes géneros de hongos filamentosos que pueden degradar HPAs, entre los que destacan géneros de basidiomicetos y ascomicetos como: *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, además de levaduras como *Candida* sp. (Aranda, 2016; Nurdiani *et al.*, 2015; Hazen *et al.*, 2016). Los basidiomicetos han sido objeto de estudio por muchas décadas, debido a la eficacia de sus enzimas degradadoras de lignina (Aranda, 2016). Sin embargo, los hongos ligninolíticos no pueden competir en ambientes naturales en ausencia de estos sustratos lignocelulósicos, los cuales raras veces se encuentran en ambientes contaminados con HPAs y PhCo. (Aranda, 2016). Según reportes realizados, la mayoría de los suelos están colonizados principalmente por especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecylomyces* y *Debaryomyces*, todos pertenecientes a la división Ascomycota (Hazen *et al.*, 2016). Los Ascomycotas representan una de las divisiones con mayor número de especies, proporcionando una gran diversidad de estilos de vida (Aranda, 2016) (Tabla 3).

Tabla 3. Referencias de cepas fúngicas que degradan HPAs.

Cepa	Remoción HPAs	División		Referencia
		Ascomycota	Basidiomycota	
<i>T. viride</i>	39% de benzo (a) pireno	X		Verdin <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma harzianum</i>	69.1% de la mezcla (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluroanteno, pirenodel, antraceno, criseno, fluoranteno, pireno, dibenzo antraceno, pirileno)	X		Zafra y Cortés-Espinosa, 2005
<i>Aspergillus</i> sp.	60 % de benzo (a) pireno	X		Wu <i>et al.</i> , 2009
<i>A. sclerotiorum</i>	76.6 % de benzo (a) pireno y 99.7%	X		Passarini <i>et al.</i> , 2011

	de pireno			
<i>A. versicolor</i>	19.9 de pireno, 15.5 de fluoranteno y 11.5 de antraceno	X		Petit <i>et al.</i> , 2013
<i>T. asperellum</i>	74% de fenantreno, 63% de pireno y 81% de benzo (a) pireno	X		Zafra <i>et al.</i> , 2015

En los últimos años han aumentado los estudios de hongos en la degradación de PhCo, debido a su elevada persistencia en los ecosistemas y su resistencia a los tratamientos convencionales en plantas depuradoras de agua (Kosjek *et al.*, 2007). En la actualidad existen estudios relacionados con la utilización de hongos ligninolíticos para remover compuestos farmacéuticos como diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, entre otros (Haroune *et al.* 2016). Entre las cepas estudiadas se encuentran: *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete sordida*, *T. versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* (Marco-Urrea *et al.*, 2009; Marco-Urrea *et al.*, 2010a; Rodríguez *et al.*, 2010a, 2010b; Hata *et al.*, 2010^a; Cabana *et al.*, 2011; Morató, 2013) (Tabla 4).

Tabla 4. Referencias de cepas fúngicas que degradan PhCo.

Cepa	Remoción PhCo	División		Referencia
		Ascomycota	Basidiomycota	
<i>P. sordida</i> YK-624	100% de diclofenaco y 90% de ácido mefetamínico		X	Hata <i>et al.</i> , 2010
	80% de bisfenol A (disruptor endócrino)			Wang <i>et al.</i> , 2013
<i>T. versicolor</i>	95% de ketoprofeno			Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2010
	95 - 100 % de acetaminofén, ibuprofeno, naproxeno, keptoprofeno e indometacina		X	Haroune <i>et al.</i> , 2014
<i>P. chrysosporium</i>	100% de naproxeno y 80% de carbamazepina		X	Li <i>et al.</i> , 2015

Todos los estudios mencionados anteriormente demuestran la evidencia de hongos basidiomicetos y ascomicetos capaces de remover HPAs y PhCo. Sin embargo, no existen reportes que mencionen la existencia de ascomicetos degradadores de HPAs y PhCo en presencia de halofilia. La importancia de realizar estudios con cepas que presenten estas características está relacionada con la presencia de condiciones extremas en los ecosistemas acuáticos contaminados con HPAs y PhCo, como es el caso de elevados valores de salinidad (> 0.5 M), bajos valores de pH (\approx 2 - 4), entre otros.

1.8. Hongos halófilos

En las últimas décadas, se ha propuesto el uso de microorganismos extremófilos para la biodegradación de xenobióticos como una alternativa muy atractiva, debido a que estos poseen extremoenzimas que facilitan la degradación de contaminantes en condiciones extremas. Los organismos extremófilos crecen de manera óptima ante la presencia de una condición fisicoquímica extrema como altas o bajas temperaturas (termófilos y psicrófilos respectivamente), pHs extremadamente ácidos o alcalinos (acidófilos y alcalófilos) y altas concentraciones de sal (halófilos/halotolerantes), entre otros (Dopson *et al.*, 2016). Se define como condición extrema de crecimiento aquella que dista notablemente de las condiciones definidas como idóneas para la vida de los seres humanos: 25 °C, 1 atm de presión, pH neutro, salinidad menor a 0.3 M. Los organismos extremófilos son capaces de degradar xenobióticos mediante la excreción de extremoenzimas, las cuales son secretadas en condiciones extremas, sin embargo, también son encontradas en condiciones normales. Ejemplo de estas enzimas podemos mencionar las lacasas y peroxidasas excretadas ante la presencia de compuestos ligninolíticos o xenobióticos tanto en basidiomicetos como en ascomicetos (Nigam, 2013).

Los hongos halófilos son microorganismos que alcanzan su crecimiento óptimo en presencia de concentraciones de sal mayores a 0.5 M, por lo que son considerados extremófilos. La utilización de hongos halófilos es considerada una estrategia atractiva para atender a las necesidades de los ecosistemas contaminados y generar soluciones ambientales dirigidas a la restauración de los mismos (Naranjo-Briceno *and* Perniam, 2013). Estos microorganismos requieren de adaptaciones en su pared celular y en la composición lipídica de sus membranas citoplasmáticas para poder efectuar su ciclo de vida. Tales adaptaciones les permiten la acumulación de compuestos iónicos o no iónicos u orgánicos de bajo peso molecular como: K⁺, Cl⁻, aminoácidos y azúcares, entre otros, que les permiten sobrevivir a las condiciones de actividad de agua y/o toxicidad (Neifar *et al.*, 2015).

Especies como *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii* y *Wallemia ichthyophaga*, han sido reportados como cepas fúngicas aisladas de ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Entre las especies del género *Aspergillus* que se han aislado y descrito como halotolerantes o halófilas, se encuentran *A. niger*, *A. sydowii*, *A. flavus*, *A. tubingensis* y *A. versicolor*. *Aspergillus*

destaca de otros microorganismos debido a que algunas especies, pueden crecer en condiciones extremas de cultivo como, por ejemplo: amplios intervalos de temperaturas (10-50°C), pH (2-11) y salinidad (0-6.34 M), entre otras, así como degradar y metabolizar HPAs (Verdin *et al.* 2004; Atagana 2009; Meyer *et al.*, 2011).

A pesar de lo mencionado anteriormente, existen pocos estudios relacionados con la degradación de xenobióticos mediante la utilización de hongos aislados de ambientes hipersalinos (>0.5M). Cabe destacar de igual manera, que no existen estudios relacionados con la degradación de PhCo mediante la utilización de cepas halófilas, como tampoco existen reportes hasta el momento de cepas fúngicas halófilas capaces de degradar HPAs y PhCo en condiciones hipersalinas. Por lo tanto, resulta de gran interés la búsqueda de hongos halófilos con estas capacidades, debido a la presencia de altas concentraciones de sales en las aguas residuales (tratadas y no tratadas) de las industrias farmacéuticas y petroleras, como se ha mencionado anteriormente. Estudios previos realizados por Batista-García y colaboradores en el período del 2014 al 2016, se enfocaron en la búsqueda de hongos halófilos y halotolerantes con actividades ligninolíticas en presencia de HPAs y PhCo. Atendiendo a criterios taxonómicos, micromorfológicos y moleculares, se identificaron cepas de *Aspergillus sydowii*-like H1, *Cadophora* sp. TS2, *Emericellopsis* sp. TS11 y *Pseudogymnoascus* sp. TS12, los cuales son capaces de degradar HPAs y PhCo en condiciones hipersalinas, sin embargo, cabe destacar que los mismos no fueron aislados de condiciones hipersalinas, con excepción del primero.

HIPÓTESIS

Las cepas *Aspergillus sydowii*-like H1 y *Aspergillus destruens* EXF-10411 serán capaces de degradar compuestos de naturaleza aromática (HPAs y farmacéuticos) en condiciones hipoersalinas.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la eficiencia de remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos de las cepas *Aspergillus sydowii*-like H1 y *Aspergillus destruens* EXF-10411 en condiciones hipersalinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la tolerancia de *A. sydowii*-like H1 y *A. destruens* EXF-10411 a benzo (a) pireno y fenantreno en medio salino y suplementado.
2. Evaluar la eficiencia de remoción de *A. sydowii*-like H1 y *A. destruens* EXF-10411 en medios de cultivos con HPAs y compuestos farmacéuticos como única fuente de carbono.
3. Evaluar la eficiencia remoción de *A. sydowii*-like H1 y *A. destruens* EXF-10411 de HPAs en aguas residuales reales provenientes de una biorrefinería de Quebec (Canadá).
4. Determinar la actividad enzimática extracelular lacasa, peroxidasa y esterasa en la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos.
5. Evaluar la toxicidad de los sobrenadantes del proceso de remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos sobre la germinación de *Cucumis sativus*.

CAPÍTULO 2

2.1. Microorganismos y reactivos

Las cepas fúngicas utilizadas durante este trabajo fueron *Aspergillus sydowii*- like H1 y *Aspergillus destruens* EXF-10411, las cuales pertenecen al *phylum* Ascomycota y fueron aisladas de una fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar y de una pintura de caballete en Eslovenia, respectivamente. Estas cepas fueron conservadas en placas Petri sobre Agar Extracto de Malta (AEM) a 4 °C. Adicionalmente, se conservaron esporas de estas cepas en una solución de glicerol 20% a -80 °C.

Para todos los experimentos se utilizó 1.0 y 1.9 M de NaCl, concentración óptima para el crecimiento de *A. sydowii* y *A. destruens*, respectivamente.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de las firmas: Merck (Cloruro de sodio (NaCl) y Hexano); Sigma-Aldrich (Benzo (a) pireno, Fenantreno, Tritón, 2-Naftil acetato, Fast Garnet, ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) y Extracto de Malta) y Bio- Rad (Seroalbúmina Bovina (BSA), Reactivo de Bradford y Folin-Ciocalteu).

2.2. Medios de cultivo y soluciones stock

Preparación de medio salino

Medio salino (modificación del medio Vogel, 1956): Para la preparación de medio salino se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada: 7.8 mg de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 18 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de ZnSO_4 , 50 mg de KCl, 1 g de K_2HPO_4 y 2 g de NH_4NO_3 . Luego se ajustó el pH a 6 con ácido fosfórico – KOH al 0.25 N y se esterilizó en autoclave. Se adicionó 2% de agar cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido.

Buffer de Citrato (0.01 M), pH 5: Se preparó una solución de citrato de sodio, la cual contenía 1,47 g de citrato de sodio en 100 mL de agua destilada. Posteriormente se obtuvo una solución de ácido cítrico, para lo cual se adicionó 0.96 g del ácido en 100 mL de agua destilada. Por último, se mezcló en un vaso de precipitado, 60 mL de la solución de citrato de sodio y 40 mL de la solución de ácido cítrico, para obtener un volumen final de 100 mL. Se ajustó el pH a 5.

Buffer fosfato (PBS 10 X), pH 7: En 1 L de agua destilada se adicionó: 80g de NaCl, 2 g de KCl y 14.4 g de Na₂HPO₄. Posteriormente se ajustó el pH a 7.

Buffer fosfato (PBS 1X): Se preparó una solución que contenía 80 mL de agua destilada y 20 mL de PBS 10X.

Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%: Se preparó una solución que contenía 50 mL de PBS 1X y 50 µL de Tritón 100X (comercial: Sigma-Aldrich, 21568-2500).

Solución de 2-Naftil acetato, 250 mM: Se adicionó 5 mg de 2-naftil acetato (comercial: Sigma-Aldrich, N-6875) en 500 µL de acetato de sodio (58 %).

Solución de Fast Garnet : Se adicionó en 100 µL de PBS 1X – Tritón (0.1%), 10 mg de Fast Garnet (comercial: Sigma-Aldrich, F8761-5G).

Buffer fosfato (PBS 1X) con Tritón 0.1%: Se adicionó en 90 mL de agua destilada, 100 µL de Tritón 100X y 10 mL de PBS 10X.

Preparación de sustratos para la medición de las actividades enzimáticas:

Solución para esterasas

Se preparó una solución que contenía 10 mL de PBS 1X – Tritón (0.1 %), 50 µL de 2-naftil acetato y 10 µL de Fast Garnet.

Solución de ABTS, 30 mM

Se adicionó en 10 mL de agua destilada, 164.6 mg de ABTS (comercial: Sigma-Aldrich, A 1888-5G). Al finalizar la preparación se cubrió el frasco con papel de aluminio, debido a que el reactivo

es fotosensible.

Solución de peróxido al 3 %

Se añadió en 10 mL de agua destilada, 170 μ L de peróxido de hidrógeno al 30 % (comercial: Sigma-Aldrich, 216763-100ML).

Reactivo de Bradford

En agua destilada estéril se realizó una mezcla con una relación 1:4 del reactivo de Bradford (comercial: Bio- Rad, B 6916).

Reactivo de Lowry (reactivo de Biuret y reactivo de Folin-Ciocalteu)

Reactivo de Biuret: En 50 mL de 0.1 N de hidróxido de sodio se agregó 1g de carbonato de sodio. Posteriormente se añadieron 500 μ L de sulfato de cobre 1% y 500 μ L de tartrato de sodio potasio 2%.

Reactivo de Folin-Ciocalteu: Se realizó una disolución 1:2 del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (comercial: Bio- Rad, 2790) en agua destilada.

2.3. Crecimiento óptimo en presencia de HPAs en condiciones hipersalinas

Se obtuvo un cultivo fresco (7 días) de cada cepa sobre medio agar extracto de malta. El preinóculo fue incubado a 28 °C. Luego, se inocularon cajas Petri con medio salino (MS) agarizado suplementado con 1 y 1.9 M de NaCl para el cultivo de *A. sydowii-like* y *A. destrudens*, respectivamente, atendiendo a las concentraciones de NaCl para su crecimiento óptimo. Al medio de cultivo, una vez esterilizado, se adicionó una mezcla de benzo (a) pireno:fenantreno (1:1) hasta alcanzar concentraciones finales de 60, 120, 200 y 240 ppm. Para la preparación de las cajas Petri suplementadas con HPAs se adicionó en condiciones estériles 30 mL de medio de cultivo e inmediatamente se agregó el volumen de HPAs de la solución stock correspondiente a cada concentración de HPAs deseada. Se agitó cuidadosamente y se dejó solidificar. En este caso, la mezcla de HPAs constituyó la única fuente de carbono. Las cajas Petri fueron inoculadas con un cilindro de inóculo de 7 mm de diámetro y fueron

incubadas a 28 °C por 15 días. Cada 24 h se procedió a medir el diámetro de la colonia hasta obtener la misma medición por 3 días consecutivos.

Se obtuvieron curvas de crecimiento a partir de los valores del diámetro de la colonia crecidas en MS sólido suplementado con las diferentes concentraciones de benzo (a) pireno:fenantreno como única fuente de carbono, como se explicó en el párrafo anterior. A partir de estos valores se calculó la velocidad específica de crecimiento de cada cepa en cada concentración ensayada de benzo (a) pireno:fenantreno y en cada ensayo. La velocidad específica de crecimiento se obtuvo a partir de gráficas logarítmicas donde se graficó el diámetro de la colonia (eje y) vs el tiempo (eje x). Posteriormente se realizó un ajuste lineal de los datos de acuerdo al método de mínimos cuadrados y se obtuvo la ecuación correspondiente a una recta (ecuación del tipo $ax+by+c=0$). El valor de la pendiente resultante se definió como la velocidad específica de crecimiento (μ).

También se obtuvo la velocidad específica de crecimiento para cada una de las cepas en medio AEM suplementado con hidrocarburos (benzo (a) pireno:fenantreno 1:1). Para ello, se realizó exactamente el experimento descrito anteriormente. Se realizaron tres experimentos independientes cada uno con tres réplicas.

2.4. Tolerancia de *A. sydowii-like* y *A. destrudens* a diferentes concentraciones de HPAs

Con el objetivo de determinar la tolerancia de las cepas en estudio a diferentes concentraciones de BaP y Fen, se realizaron curvas de crecimiento en AEM suplementados con benzo (a) pireno:fenantreno (1:1) (60, 120, 200 y 240 ppm, concentración final). El medio AEM fue preparado con medio salino en lugar de agua destilada. En todos los casos se adicionó BaP y Fen en concentraciones de 30:30 ppm, 60:60 ppm, 100:100 ppm y 120:120 ppm, a partir de una solución stock de 7,000 ppm de los HPAs en acetona. Simultáneamente, se inoculó un control sin la adición de HPAs, el cual consistió solamente en AEM suplementado con el mismo volumen de acetona utilizado en los tratamientos. En todos los casos, se utilizó la concentración de NaCl definida para el crecimiento óptimo de cada cepa.

De igual manera para la preparación de las cajas Petri suplementadas con HPAs se adicionó en

condiciones estériles 30 mL de medio de cultivo e inmediatamente se agregó el volumen de HPAs de la solución stock correspondiente a cada concentración de HPAs deseada. Se agitó cuidadosamente y se dejó solidificar. Posteriormente se inoculó un cilindro de inóculo de 7 mm de diámetro sobre las placas ya solidificadas, las cuales fueron incubadas a 27°C durante 18 días. Como control se inoculó en placas sin HPAs. El experimento se realizó por triplicado.

Se midió el crecimiento radial de la colonia, cada 24 h, restando en todos los casos el diámetro del cilindro de inóculo (7 mm). Las mediciones se tomaron hasta obtener un valor constante de diámetro por 3 días consecutivos.

Se calculó la Tasa de Tolerancia (TR) expresada como porcentaje de la inhibición del crecimiento micelial (% MGI, siglas en inglés, Micelyum Growth Inhibition) según Lee *et al.* 2014:

$$TR = (FGR/GCR) * 100$$

donde:

FGR: Tasa de crecimiento del hongo

GCR: Tasa de crecimiento del cultivo control

TR: Tasa de tolerancia

2.5. Remoción de HPAs en medios de cultivos sintéticos y aguas residuales

Para cada cepa en estudio se obtuvieron cultivos frescos de 7 días sobre AEM. Posteriormente 2 cilindros de inóculos de 7 mm de diámetro cada uno se inocularon en matraces de 500 mL que contenían 100 mL de medio líquido extracto de malta. Los matraces fueron incubados por 4 días a 28 °C y 150 rpm con el propósito de obtener biomasa (preinóculo). Para la obtención del preinóculo se utilizaron las concentraciones de NaCl para el crecimiento óptimo de cada cepa. Posteriormente, el cultivo del preinóculo fue centrifugado para obtener la biomasa, la cual fue lavada tres veces consecutivas con solución salina 0.1%, con el objetivo de eliminar el exceso de medio extracto de malta.

Se prepararon matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio salino suplementado con NaCl (concentración óptima de crecimiento para cada cepa en estudio) y una concentración final de 100 ppm de benzo (a) pireno: fenantreno (1:1). Los matraces de MS con NaCl suplementados con HPAs, se inocularon con 2.5 g de micelio húmedo (preinóculo)

obtenido como se describió en el párrafo anterior. Los cultivos se incubaron durante 12 días a 28 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras de sobrenadantes (3 mL) a 0, 4, 8 y 12 días del experimento. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g durante 20 minutos. De esta manera se obtuvo el sobrenadante para determinar la concentración residual de benzo (a) pireno y fenantreno.

Para la determinación de los HPAs a partir de los sobrenadantes obtenidos, se realizaron 3 extracciones consecutivas líquido-líquido utilizando hexano puro. Para ello se tomaron 3 mL de sobrenadantes y se mezclaron con 3 mL de hexano, se agitaron vigorosamente por 2 minutos y se dejaron separar las fases para colectar la fase hexánica (conteniendo HPAs) y a la fase acuosa se le realizaron 2 extracciones más de igual manera. Se concentraron los \approx 9 mL de hexano extraídos hasta 1 mL para ser utilizados en la determinación de benzo (a) pireno y fenantreno mediante cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS).

Para determinar la adsorción de los HPAs al micelio, se tomaron 2.5 g de la biomasa contenida en los matraces a los días 0 y 12 del experimento. Se centrifugó la biomasa y se realizaron las extracciones líquido-sólido con 3 mL de hexano. Se agitó vigorosamente por 2 minutos (formar emulsión), se dejaron reposar para separar las fases y se realizó la extracción de la fase hexánica (conteniendo HPAs) y a la fase acuosa-sólida se le realizaron 2 extracciones más de igual manera. Se concentraron los \approx 9 mL de hexano extraídos hasta 1 mL (pasando por una corriente de aire para evaporar el solvente) para ser utilizados en la determinación de benzo (a) pireno y fenantreno, de igual manera en GC-MS.

La determinación de benzo (a) pireno y fenantreno se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) bajo los procedimientos descritos por (Lee *et al.*, 2010, 2014). El análisis de GC-MS se realizó en un cromatógrafo de gases G1800A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización de electrones y una columna de sílice fundida HP-5 MS (30 mx 0,25 mm id, 0,25 mm de espesor de película) (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA).

La remoción de HPAs en aguas residuales se realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, solamente se empleó agua residual conteniendo los HPAs en lugar de medio salino con HPAs. La concentración de NaCl en el agua residual se estimó \approx 1M por conductividad. Se determinaron las concentraciones de los HPAs presentes en los

sobrenadantes y micelio, de la manera antes descrita. Todos los experimentos y análisis se realizaron por triplicado.

2.6. Remoción de compuestos farmacéuticos en medios de cultivos sintéticos

Primeramente, se llevó a cabo el proceso de peletización, mediante una adaptación del método de Marco-Urrea *et al.*, 2008. En matraces de 500 mL que contenían 125 mL de EM se inocularon dos cilindros de inóculos de cada una de las cepas en estudio. Los matraces fueron incubados durante 7 días a 26 °C y 135 rpm. Posteriormente, se filtró la biomasa obtenida y se enjuagó con solución salina estéril al 0.1%. Posteriormente la biomasa obtenida se mezcló con solución salina y se almacenó a 4 °C por 24 h, esta primera mezcla lleva por nombre “Solución de Grumos” (SG). A continuación, se añadieron 2 mL de la SG en un matraz de 1 L que contenía 250 mL de medio de cultivo EM, el cual fue incubado por 7 días a 26 °C y 135 rpm. La biomasa obtenida se filtró y se lavó con solución salina estéril 0.1%; esta biomasa se mezcló con solución salina estéril 0.1% y se almacenó a 4 °C por 24 h. Esta segunda mezcla obtenida se nombró “Solución de micelio” (SM), la cual le da las formas de gránulos más reproducibles al micelio (tamaño y forma homogénea) (Haroune *et al.*, 2014, Marco-Urrea *et al.*, 2008).

Los estudios de biodegradación se realizaron en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo con 0.5 mL de la solución de micelio. Los matraces fueron incubados durante 2 días a 26 °C y 135 rpm se obtuvieron gránulos homogéneos de micelio y se añadió 50 µL de una solución que contenía 5 PhCo (acetaminofén, ibuprofeno, indometacina, ketoprofén y ácido mefenámico) en una concentración de 100 mg L⁻¹ cada uno, para una concentración final de 500 mg/L. Cada 3 días, se colectaron alícuotas de cada matraz (tres repeticiones) y se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0.22 µm (Haroune *et al.*, 2016), para realizar la cuantificación de PhCos. Los sobrenadantes para la cuantificación de PhCo se analizaron siguiendo la metodología de Haroune *et al.*, 2014, que propone utilizar una fuente de ionización por electrospray positiva (ESI +) en el modo de Monitoreo de Multi-Reacción en un espectrómetro de masas Acquity UPLC XEVO TQ (Waters Corporation, Milford, MA) equipado con una columna Acquity UPLC HSS-T3 mm x 2,1 mm, 1,8 lm).

2.7. Cuantificación de la concentración de enzimas extracelulares en la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en medios sintéticos y aguas residuales.

Se determinaron cuantitativamente las actividades lacasas, esterases y peroxidasas, así como las concentraciones de proteínas totales a partir de los sobrenadantes colectados en los experimentos de remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en medios sintéticos y de HPAs a partir de aguas residuales reales.

2.7.1. Cuantificación de la actividad peroxidasa

La reacción enzimática consistió en 80 μL de buffer citrato al (0.01 M) pH 5, 10 μL de ABTS (concentración final en la mezcla de reacción de 1 mM), 10 μL de peróxido de hidrógeno al 0.005 % y 200 μL de sobrenadante, para un volumen final de 300 μL . Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Una vez que se añadió el ABTS a la reacción, se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 420 nm durante 18 minutos y en intervalos de 3 minutos. El coeficiente de extinción molar del ABTS fue de $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Haroune *et al.* 2014; Touahar *et al.* 2014). El blanco utilizado incluyó 280 μL de buffer citrato, 10 μL de ABTS y 10 μL de peróxido de hidrógeno.

2.7.2. Cuantificación de la actividad lacasa

La reacción enzimática consistió en 90 μL de buffer citrato al (0.01 M), 10 μL de ABTS (concentración final en la mezcla de reacción de 1 mM) y 200 μL de sobrenadante para un volumen final de 300 μL . Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Una vez que se añadió el ABTS a la reacción, se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 420 nm durante 18 minutos y en intervalos de 3 minutos. El coeficiente de extinción molar del ABTS fue de $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Haroune *et al.* 2014; Touahar *et al.* 2014). El blanco utilizado incluyó 110 μL de ABTS y 90 μL de buffer citrato.

2.7.3. Cuantificación de la actividad esterasa

La reacción enzimática consistió en 200 μL del sustrato para esterases preparado anteriormente y 100 μL de sobrenadante para un volumen final de 300 μL . Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Una vez que se añadió el sustrato para esterases a la reacción se monitorearon

las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 538 nm durante 30 minutos y en intervalos de 5 minutos. El coeficiente de extinción molar utilizado fue de 23 598 M⁻¹cm⁻¹. (Batista-García et al. 2014). El blanco utilizado incluyó 200 µL y 100 µL de buffer PBS 1X-Tritón (0.1 %).

Las actividades enzimáticas se monitorearon mediante un espectrofotómetro UV-Vis (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) de acuerdo con las metodologías anteriormente descritas.

Se graficaron los valores de absorbancia obtenidos en el equipo (eje y) contra los tiempos (eje x). Los datos se ajustaron a una línea recta garantizando un R² > 0.99. Se determinó la pendiente en cada caso y se utilizó la siguiente fórmula para determinar la actividad volumétrica:

$$AV \text{ (UI / L)} = \Delta DO / \text{minuto} * V_f / \epsilon * b * V_{enz}$$

donde:

AV (UI / L): actividad volumétrica en unidades internacionales por litro

ε: coeficiente de extinción molar de la absorbancia que absorbe a la λ del análisis

b: trayectoria óptica = 1 cm

V_f: volumen final

V_{enz}: volumen de reacción enzimática

2.8. Ensayos toxicológicos

Se utilizó como ensayo toxicológico el ensayo de germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus*), modelo que ha sido ampliamente utilizado en la literatura (UNICHIM 1651, Critto *et al.*, 2007 y Roig *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2015). Los ensayos de germinación de las semillas de pepino se realizaron en algodones estériles que contenían los sobrenadantes extraídos en cada uno de los experimentos realizados. A continuación, se muestra en detalle cómo se realizó este ensayo.

A partir de los sobrenadantes obtenidos a tiempo 12 de los experimentos de remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos, se realizó una extracción líquido-líquido como se explicó en la sección 2.5 para recuperar los contaminantes. Esta extracción también sirvió para eliminar el NaCl presente en los sobrenadantes. Los contaminantes, tanto HPAs como fármacos, se

resuspendieron en 2 mL de acetona 100%, la solución se rotoevaporó hasta 1 mL. Se mezcló la solución de acetona con contaminantes con 19 mL de agua destilada estéril para alcanzar un volumen final de 20 mL. Se adicionó esta mezcla a tubos Falcon estériles de 50 mL, los cuales contenían en su interior 2 g de algodón, previamente esterilizado. Se aplicaron 5 semillas de pepino por tubo Falcon y se incubaron en la oscuridad por 7 días a 25 °C. Posteriormente se midió el tamaño de las plántulas. Los controles utilizados en este experimento fueron los siguientes: como control positivo (agua destilada sin esterilizar) y como control negativo (sobrenadantes sin inocular). Se realizó el ensayo por triplicado.

2.9. Diseño experimental y análisis estadístico

Se llevaron a cabo métodos estadísticos aplicando análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los valores obtenidos en cada uno de los experimentos. Primeramente, se verificó el análisis de homogeneidad de varianza (prueba de Levene) y distribución normal (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Lilliefors) mediante ANOVA. Posteriormente se realizaron ANOVA para demostrar similitudes o diferencias entre las mediciones de los datos y finalmente, se realizó un análisis post hoc Tukey HSD (diferencia de significación honesta), este análisis indica la naturaleza de las diferencias encontradas en los ANOVAs. Los niveles de significación siempre se expresan como un valor de $p < 0,05$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado ($n = 3$). Se utilizó el software de análisis de datos StatSoft, Inc. (2004) STATISTICA software, versión final).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Crecimiento de *A. sydowii*-like y *A. destruens* en presencia de benzo (a) pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas

La Tabla 5 muestra los valores obtenidos luego de calcular las velocidades específicas de crecimiento (μ) y el porcentaje de tolerancia a HPAs de *A. sydowii*-like y *A. destruens* posterior a 20 días de crecimiento. Se evidenció que los valores de μ obtenidos para los controles (MS y AEM, ambas condiciones sin presencia de HPAs) de *A. sydowii*-like y *A. destruens*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas para cada una de las especies. Las velocidades específicas de crecimiento obtenidas a partir de los controles evidencian que *A. sydowii*-like muestra una tasa de crecimiento mayor que *A. destruens*. En el caso de *A. sydowii*-like se observó un crecimiento lento en presencia de 60 ppm ($\mu = 0.1 \pm 0.01$ 1/día), mientras que a 120, 200 y 240 ppm de la mezcla benzo (a) pireno:fenantreno no se evidenció crecimiento. Por su parte, *A. destruens* no mostró crecimiento en ninguna de las cuatro concentraciones de HPAs utilizadas como única fuente de carbono. Al analizar los resultados del experimento en presencia de AEM suplementado con HPAs, *A. sydowii*-like presentó mayor crecimiento que *A. destruens*. Estos resultados sugieren que cuando estos hongos se encuentran en presencia de HPAs como única fuente de carbono su crecimiento es limitado al compararlo con el crecimiento en presencia de un medio enriquecido como es el caso de AEM.

Tabla 5. Velocidades específicas de crecimiento y tolerancia en presencia de benzo (a) pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas a los 20 días.

Especies	Parámetros		Control	B(a)P:Fen (1:1) Concentración (ppm)			
				60	120	200	240
<i>A. sydowii</i>	μ en AEM	(1/día)	1.3 ± 0.2^a	0.9 ± 0.1^b	1.0 ± 0.2^b	1.0 ± 0.2^b	0.8 ± 0.1^b
	Tolerancia	(%)	100 ^a	69.2 ± 3.1^b	76.9 ± 3.3^b	76.9 ± 5.8^b	$61.5 \pm .2.6^c$
<i>A. destruens</i>	μ en AEM	(1/día)	0.7 ± 0.1^b	0.3 ± 0.01^d	0.2 ± 0.01^d	0.2 ± 0.01^d	0.2 ± 0.01^d
	Tolerancia	(%)	100 ^a	42.9 ± 0.4^d	28.6 ± 1.3^e	28.6 ± 1.1^e	28.6 ± 0.3^e

μ : Velocidad específica de crecimiento; **AEM**: Agar Extracto de Malta.

B(a)P: Benzo (a) pireno; **Fen**: Fenantreno.

a, b, c, d y e como superíndice: Órdenes estadísticos diferentes.

Estudios realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos (LBMH) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en 2017 (Ide-Pérez, 2017, Tesis de licenciatura), revelaron que *A. sydowii-like* tiene la capacidad de tolerar 100 ppm de benzo (a) pireno o fenantreno de manera independiente, es decir en presencia de uno u otro compuesto. Al comparar los valores obtenidos en el LBMH en 2017, se evidenció que existen mayores valores de μ para el caso de *A. sydowii-like* cuando crece en presencia de 100 ppm de benzo (a) pireno o fenantreno por separado, respecto a la mezcla de ambos. Los resultados anteriores demuestran que el efecto tóxico sobre la fisiología del hongo se agudiza en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos en lugar de uno solo, independientemente que se mantenga la misma concentración final de compuestos policíclicos. Para el caso de 60 ppm de la mezcla de HPAs (30:30) se obtuvo una $\mu = 0.1 \pm 0.01$ 1/día, sin embargo, según los reportes obtenidos anteriormente en el LBMH, para 60 ppm se obtuvo una $\mu = 1.6 \pm 0.08$ 1/día en el caso de fenantreno y una $\mu = 2.3 \pm 0.04$ 1/día para benzo (a) pireno. Se evidenció de este modo la dificultad a la que se enfrentan estas cepas fúngicas al ser crecidas en HPAs como única fuente de carbono y mostrando que la mezcla de HPAs resulta un factor importante en la inhibición del crecimiento, debido posiblemente a la unión de los efectos citotóxicos de ambos HPAs (Sharma *et al.*, 2016). Zafra y colaboradores en 2014 reportaron los valores de velocidad específica de crecimiento de *A. flavus* (2.2 1/día), *A. nonius* (2.1 1/día) y *T. asperellum* (4.7 1/día) en presencia de una mezcla de HPAs (fenantreno, pireno y benzo (a) pireno) en concentraciones de 1,000; 2,000; 4,000 y 6,000 ppm. Los hongos estudiados en nuestro trabajo evidencian mejores tasas de crecimiento que los anteriormente reportados, debido a que las concentraciones de sustratos utilizado por Zafra y colaboradores se encuentra mil veces por encima de las utilizadas en nuestro experimento. Batista y colaboradores en el 2017 reportaron a *Cadophora* sp. TS 2 con una $\mu = 0.5 \pm 0.1$ 1/día y a *Emericellopsis* sp. TS 11 con una $\mu = 0.5 \pm 0.3$ 1/día; ambas cepas pertenecientes a la división ascomicetos. Sin embargo, cabe destacar que estas μ fueron obtenidas de concentraciones totales de 10 ppm de una mezcla de HPAs. Se pudo evidenciar una similitud con los valores de μ de *A. sydowii-like* ante la mezcla de HPAs en la concentración de 60 ppm total (30:30) ($\mu = 0.1 \pm 0.01$ 1/día) con los valores de μ de ambos ascomicetos mencionados anteriormente.

Al analizar los resultados de tolerancia obtenidos en *A. sydowii* - like y *A. destrudens* se observó un elevado porcentaje de tolerancia, con intervalos de 66 ± 17 a 84 ± 10 % para el

caso de *A. sydowii-like* y de 89 ± 9 a 90 ± 9 % en *A. destrudens*. *A. destrudens* mostró porcentajes de tolerancia mayores que *A. sydowii-like*. *A. sydowii-like* mostró un comportamiento creciente de tolerancia a la mezcla de HPAs, al aumentar las concentraciones totales de benzo (a) pireno y fenantreno, desde valores de 66 ± 17 % en 60 ppm hasta 84 ± 10 % en 200 ppm, valor que se mantuvo constante hasta las 240 ppm. Se determinó de esta forma que *A. sydowii-like* presenta la capacidad de tolerar altas concentraciones de la mezcla de HPAs, hasta 240 ppm. *A. destrudens* mostró en 200 ppm su mayor porcentaje de tolerancia (90 ± 9 %), obteniéndose su menor porcentaje en presencia de 240 ppm (79 ± 18 %).

Además, Ide-Pérez en 2017, también determinó que *A. sydowii-like* es capaz de tolerar hasta 100 ppm de benzo (a) pireno y fenantreno por separado, con valores de 96 % para benzo (a) pireno y 64 % para fenantreno. Estos reportes previos evidencian que *A. sydowii-like* es capaz de crecer en un amplio intervalo de concentraciones HPAs, desde 10 ppm hasta 240 ppm. Inspecciones visuales de la morfología de la colonia no revelaron cambios en la textura, forma y color de la colonia. Hasta la fecha no existen reportes sobre la tolerancia de *A. destrudens* ante la presencia de HPAs, ni en mezclas, ni por separado. Basándonos en los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que esta cepa es capaz de tolerar altas concentraciones de HPAs (desde 60 ppm hasta 240 ppm), mostrando porcentajes de tolerancia por encima del 50 % en todos los casos. Cabe destacar que no existen reportes sobre tasas de crecimiento de hongos en presencia de HPAs en condiciones de hipersalinidad, como las utilizadas en nuestro estudio. Argumedo-Delira y colaboradores en 2012, reportaron que 8 cepas de *Thricoderma* son capaces de tolerar un 89% de fenantreno en concentraciones de 0.1 mM (≈ 17.8 ppm) en cultivos líquidos a los 10 días del experimento (Hadibarata *et al.*, 2007). Este resultado nos demuestra que tanto *A. sydowii-like* como *A. destrudens* son capaces de tolerar estas concentraciones de HPAs en forma de mezclas, al paso de los 12 días del experimento y obteniendo porcentajes elevados similares a los reportados con anterioridad.

3.2. Remoción de de benzo (a) pireno y fenantreno en medios sintéticos y aguas residuales.

Luego de caracterizar la cinética de crecimiento de *A. sydowii*-like y *A. destrudens* en las condiciones descritas en la sección anterior, se procedió a la evaluación de sus potencialidades para la remoción de benzo (a) pireno y fenantreno a partir de medios sintéticos y aguas industriales.

3.2.1. Remoción de benzo (a) pireno y fenantreno en medios sintéticos.

Ambos hongos evidenciaron una excelente potencialidad para la remoción de benzo (a) pireno y fenantreno como se muestra la Tabla 6. En total ambas cepas removieron más del 97 % de benzo (a) pireno o fenantreno a partir de mezclas que contenían 100 ppm de concentración total (1:1). Como se pudo observar en *A. sydowii*-like el proceso de biodegradación fue el que prevaleció, logrando un 98.1 ± 1.6 y 99.0 ± 1.5 % de remoción de benzo (a) pireno y fenantreno, respectivamente. Sin embargo, para el caso de *A. destrudens* la adsorción fue un fenómeno de marcada relevancia en la remoción de benzo (a) pireno (44.6 ± 3.7) y no así para la remoción de fenantreno, donde el total removido correspondió a procesos de biodegradación.

Tabla 6. Degradación, adsorción al micelio y remoción total de benzo (a) pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas a los 12 días.

Cepas	Benzo (a) pireno			Fenantreno		
	Biodg (%)	Adsorción (%)	Rem. total (%)	Biodg (%)	Adsorción (%)	Rem.total (%)
<i>A. sydowii</i>	98.1 ± 1.6^a	ND	98.1 ± 1.6	99.0 ± 1.5^a	ND	99.0 ± 1.5
<i>A. destrudens</i>	54.6 ± 4.6^b	44.6 ± 3.7^c	99.2 ± 0.8	97.3 ± 1.5^a	ND	97.3 ± 1.5

Rem. total: Remoción total

Biodg: Biodegradación

ND: No detectado

Con el objetivo de analizar la cinética de los procesos de remoción en el tiempo, se evaluó la contribución de los mecanismos de bioadsorción y biodegradación a los 4, 8 y 12 días del experimento para *A. sydowii*-like (Figura 6) y *A. destrudens* (Figura 7). Nótese que ambas cepas mostraron valores similares de remoción al octavo día del experimento, alcanzando casi el 100 %. Sin embargo, al cuarto día del experimento ambas cepas mostraron valores de remoción

marcadamente diferentes, con valores cercanos al 80 % en *A. sydowii*-like (Figura 6-A) y al 60 % en *A. destrudens* (Figura 7-A). Al analizar los procesos de bioadsorción se pudo evidenciar que *A. sydowii*-like mostró valores entre un 40 y 50 % al día 4 de la remoción de benzo (a) pireno y fenantreno (Figura 6-B). Al día 8 del experimento, ambos HPAs son mayormente biodegradados, con valores de bioadsorción inferiores a un 15 % para *A. sydowii*-like. Al día 12 del experimento se observó que el 100% el benzo (a) pireno y el fenantreno removido fue mediante biodegradación. Sin embargo, *A. destrudens* mostró valores de bioadsorción aproximadamente entre un 30 y un 50 % al remover benzo (a) pireno, evidenciándose al paso del tiempo un aumento tanto en la biodegradación, como en la bioadsorción (Figura 7-B). Para el caso de la remoción de fenantreno mediante *A. sydowii*-like, se observó que pasado los 12 días del experimento solamente se evidenciaron procesos de biodegradación. De manera general podemos mencionar que en *A. sydowii*-like los procesos más importantes para la remoción fueron los procesos de biodegradación; sin embargo, en *A. destrudens* los procesos de bioadsorción también tienen relevancia a lo largo del tiempo.

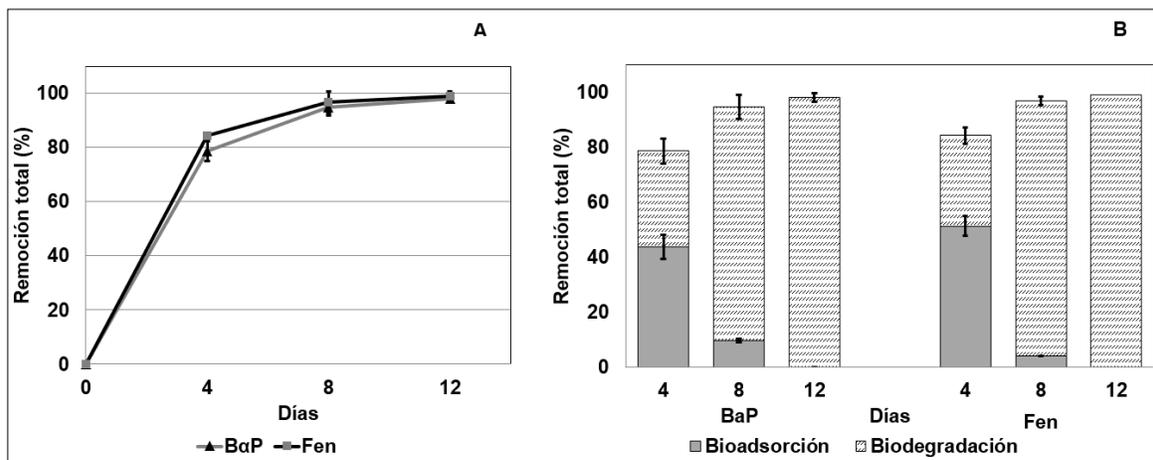


Figura 6. *A. sydowii*-like: (A) Remoción total de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 0, 4, 8 y 12 del experimento. (B) Bioadsorción y biodegradación de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 4, 8 y 12 del experimento.

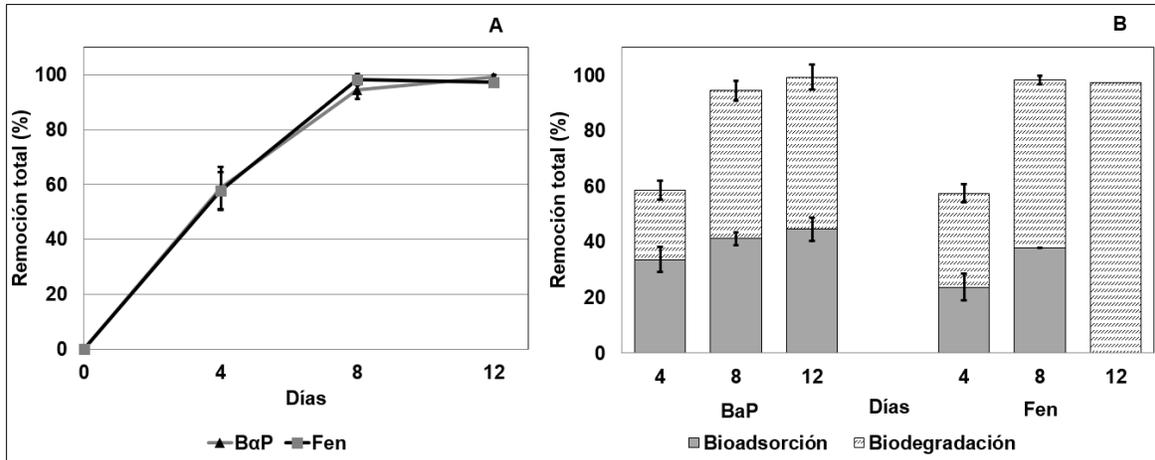


Figura 7. *A. destruens*: (A) Remoción total de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 0, 4, 8 y 12 del experimento. (B) Bioadsorción y biodegradación de benzo (a) pireno y fenantreno en tiempo 4, 8 y 12 del experimento.

Basado en los reportes existentes hasta la fecha, los cuales se muestran en la Tabla 3 presente en el Capítulo 1, podemos comparar la remoción de HPAs llevada a cabo por nuestras cepas con las reportadas hasta el momento. Podemos mencionar que *A. sydowii*-like y *A. destruens* presentaron valores de remoción de ≈ 80 y ≈ 60 % respectivamente a los 4 días del experimento (Figura 6-A y 7-A), siendo estos valores mayores a los reportados por Wu y colaboradores en 2009 (Tabla 3), los cuales partieron de una concentración inicial de 10 ppm de benzo (a) pireno. De igual manera se obtuvieron valores de remoción mayores a los reportados por Verdin y colaboradores en 2004 (concentración inicial de BaP 10 ppm) y por Passarini y colaboradores en 2011 (concentración inicial de BaP de 424 ppm) (Tabla 3). Es importante destacar que *A. sydowii*-like y *A. destruens* mostraron ser eficientes en la remoción de HPAs al transcurrir los primeros cuatro días del experimento, al compararlas con los reportes existentes (Tabla 3), los cuales se realizaron en mayor cantidad de días. Destacar de igual manera que la cepa *A. destruens* a los 12 días del experimento presentó un comportamiento diferente al obtenido en presencia de Fen, así como el observado en *A. sydowii* tanto para BaP como para Fen. Este comportamiento nos indica que al final del experimento, esta cepa presenta porcentajes de bioadsorción de BaP. Una alternativa para solucionar este comportamiento se basaría en realizar el experimento por más tiempo, de este modo la cepa pudiera activar al máximo su mecanismo de biodegradativo y minimizar el BaP bioadsorbido al micelio.

3.2.2. Remoción de benzo (a) pireno y fenantreno en aguas residuales reales.

Una vez demostrada la potencialidad de *A. sydowii*-like y *A. destrudens* de remover la mezcla de benzo (a) pireno: fenantreno 1:1 presentes en medios sintéticos, se procedió a explorar sus potencialidades para la remoción de HPAs en aguas residuales reales provenientes de una biorrefinería de la provincia de Quebec en Canadá. Este experimento se realizó con el objetivo de analizar la potencialidad de estas cepas para remover HPAs en mezclas complejas, las cuales estaban compuestas de HPAs de 2, 3, 4 y 5 anillos aromáticos unidos y otros sustituyentes cíclicos presentes en aguas industriales reales (Tabla 7). Al finalizar el experimento con ambas cepas, se logró obtener un 100% de remoción de los 13 HPAs presentes en las aguas residuales.

Tabla 7. Remoción de HPAs presentes en las aguas residuales mediante las cepas *A. sydowii*-like y *A. destrudens* a los 12 días del experimento.

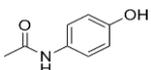
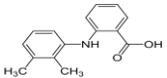
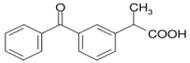
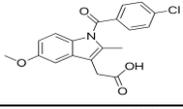
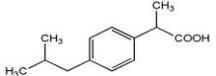
HPAs	Estructuras	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	
			<i>A. sydowii</i>	<i>A. destrudens</i>
Naftaleno		11.8	No detectado	No detectado
Acenafteno		11.9	No detectado	No detectado
Fluoreno		18.4	No detectado	No detectado
Antraceno		13.7	No detectado	No detectado
Fenantreno		212.0	No detectado	No detectado
Fluoranteno		121.4	No detectado	No detectado
Benzo(a)antraceno		18.8	No detectado	No detectado
Criseno		9.4	No detectado	No detectado
Pireno		86.8	No detectado	No detectado
Benzo(a)fluoranteno		8.4	No detectado	No detectado
Benzo[k]fluoranteno		2.9	No detectado	No detectado
Benzo(j)fluoranteno		3.2	No detectado	No detectado
Benzo(a)pireno		3.3	No detectado	No detectado
Concentración total		522	No detectado	No detectado

El porcentaje de remoción obtenido en *A. sydowii*-like (100%) ante la presencia de los quince HPAs, se encuentra por encima del obtenido por Batista y colaboradores en 2017, en el cual se obtuvo un 87.5 % de remoción al paso de los 12 días, tiempo final utilizado en nuestro experimento (12 días). En la literatura no existen reportes sobre *A. destrudens* removiendo HPAs, por lo que este es el primer estudio que demuestra la potencialidad de este hongo para la remoción de HPAs a partir de efluentes industriales. Los resultados obtenidos evidencian que las cepas *A. sydowii*-like y *A. destrudens* presentan un elevado porcentaje de remoción de benzo (a) pireno y fenantreno (100%), siendo relevantes para los procesos de biorremediación. Existen pocos estudios relacionados con la remoción de HPAs en aguas residuales reales mediante hongos ascomicetes, sin embargo, existen reportes de Petit y colaboradores en 2013 que caracterizaron un grupo de cepas fúngicas (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*) aisladas de aguas contaminados con petróleo.

3.3. Remoción de compuestos farmacéuticos en medios sintéticos

Debido a que muchas de las enzimas, tanto extracelulares como intracelulares, que participan en la remoción de HPAs, también se ha demostrado que son importantes en la remoción de compuestos farmacéuticos, se decidió probar la potencialidad de estos hongos para la remoción de cinco compuestos farmacéuticos (acetaminofén, ácido mefenámico, ketoprofeno, indometacina e ibuprofeno) en presencia de hipersalinidad (Tabla 8). Al analizar los valores obtenidos pudimos evidenciar que *A. sydowii*-like como *A. destrudens*, mostraron valores superiores al 50.3 % de remoción, observándose este valor para el caso del acetaminofén. Los valores de remoción de ácido mefenámico e ibuprofeno fueron mayores en *A. sydowii*-like y en *A. destrudens*, mostrando un intervalo de 99.0 a 100%. *A. sydowii*-like mostró menores porcentajes de biodegradación en la mezcla de compuestos farmacéuticos (3.76 a 40.7 %), respecto a *A. destrudens* (0 a 100 %). Sin embargo, *A. sydowii*-like mostró valores de bioadsorción entre los 58.9 y 79.3 %, mientras que en *A. destrudens* se evidenció un intervalo de 0 a 24%, excepto para el caso del ibuprofeno, en el cual se obtuvo un 100 % de bioadsorción.

Tabla 8. Remoción (%) de compuestos farmacéuticos a los 7 días del experimento para las cepas *A. sydowii*-like y *A. destrudens*.

Compuestos	Estructuras	(%)	Cepas	
			<i>A. sydowii</i> -like	<i>A. destrudens</i>
Acetaminofén		Biodegradación	19.4 ± 4.9	53.4 ± 4.3
		Remoción total	94.8 ± 3.2	56.9 ± 4.7
Ác. Mefenámico		Biodegradación	38.5 ± 5.9	99.2 ± 4.2
		Remoción total	99.1 ± 3.9	100
Ketoprofeno		Biodegradación	4.9 ± 1.3	58.9 ± 7.1
		Remoción total	96.6 ± 7.4	59.4 ± 4.3
Indometacina		Biodegradación	15.6 ± 4.9	58.3 ± 2.9
		Remoción total	93.4 ± 6.6	83.6 ± 5.8
Ibuprofeno		Biodegradación	23.9 ± 3.7	0
		Remoción total	100	100

Basado en los reportes existentes hasta la fecha (Tabla 4) presentes en el Capítulo 1, podemos comparar la remoción de PhCo llevada a cabo por nuestras cepas en estudio, con las existentes en la literatura. Al concluir este experimento se pudo evidenciar que tanto *A. sydowii*-like como *A. destrudens* mostraron porcentajes de remoción similares a los reportados en cepas basidiomicotas. Haroune y colaboradores en 2014, mencionan que *T. versicolor* removió ibuprofeno entre un 70 - 90 % al quinto día del experimento, partiendo de una concentración inicial de $\approx 20 - 500 \times 10^{-6}$ ppm. De igual manera Hata y colaboradores en 2010, publicaron que *Phanerochaete. sordida* YK-624 removió un 90% de ácido mefenámico pasados los seis días del experimento ante una concentración inicial de ≈ 250 ppm. Al comparar estos resultados con los obtenidos en *A. sydowii*-like y *A. destrudens*, se evidenció que al paso de los 7 días ambas cepas mostraron porcentajes elevados de remoción de la mezcla de PhCo utilizada. Estos resultados nos permiten determinar que ambas cepas en estudio son capaces de remover compuestos farmacéuticos con la misma eficiencia que los basidiomicetos, lo cual pone en ventaja a los ascomicetos utilizados. De igual manera cabe destacar que este es el primer trabajo realizado con ascomycetes que degradan compuestos farmacéuticos activos, a pesar de haberse utilizado bajas concentraciones de estos xenobióticos en el experimento.

3.4. Cuantificación de las actividades enzimáticas

Durante la remoción de HPAs tanto en medios sintéticos como en aguas residuales y durante la remoción de compuestos farmacéuticos, se determinaron algunas de las actividades enzimáticas extracelulares involucradas en estos procesos (lacasa, esterasa y peroxidasa) (Martínez-Martínez *et al.*, 2004; Casieri *et al.*, 2010; Haroune *et al.*, 2014; Aranda, 2016 y Sharma *et al.*, 2016). *A. destrudens* presentó valores de las tres enzimas en estudio superiores a las de *A. sydowii*-like. La actividad esterasa encontrada en ambas cepas y en las tres condiciones estudiadas, fue más elevada que las actividades lacasa y peroxidasa. La presencia de altos valores de esterases es de gran relevancia en este experimento, debido a que esta enzima no se encuentra reportada entre las más estudiadas en los procesos de hidrólisis y mineralización de HPAs (Martínez-Martínez *et al.*, 2014 y Sharma *et al.*, 2016). A pesar de ser bajas las actividades lacasas y peroxidasas encontradas, éstas se consideran importantes en la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en aguas contaminadas, debido a que son las principales enzimas citadas en estos procesos (Casieri *et al.*, 2010; Haroune *et al.*, 2014). Las lacasas son proteínas que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos y no aromáticos con bajo potencial redox. Se conoce que las lacasas son capaces de catalizar la oxidación de HPAs en presencia de mediadores. Estos mediadores son oxidados mediante la remoción de un electrón que, en la mayoría de los casos, genera un radical libre. Algunos de estos radicales libres tienen la capacidad de oxidar HPAs. Las peroxidasas por su parte también son enzimas oxidativas, las cuales utilizan peróxido de hidrógeno como aceptor final de electrones y catalizan la oxidación de uno o dos electrones de sustratos orgánicos; esta enzima se encuentra reportada en numerosos estudios en la remoción de fenantreno (Song HG, 1999; Sing H, 2006; Haritash y Kaushik, 2009; Agrawal *et al.*, 2018).

3.4.1. Cuantificación de las actividades enzimáticas en medios sintéticos y aguas reales con HPAs.

Al analizar los valores de actividades obtenidas en medios sintéticos con HPAs (Figura 8 y Tabla 9), se observó que *A. destrudens* mostró su menor actividad lacasa al día 4 y su mayor actividad al octavo día, disminuyendo los valores de actividad hasta el día 12. *A. sydowii*-like mostró su menor actividad lacasa en tiempo 8 y la mayor en el día 12. Al octavo día del experimento ambas cepas mostraron comportamientos totalmente diferentes, observándose

el mayor valor de actividad lacasa para *A. destrudens* y el menor para *A. sydowii*-like. Por otra parte, los valores obtenidos de actividades peroxidadas mostraron un comportamiento similar en ambas cepas, sin embargo, *A. destrudens* obtuvo mayor actividad enzimática que *A. sydowii*-like. La mayor actividad peroxidasa para ambas cepas se obtuvo al cuarto día para disminuyendo hasta tiempo 12. Al analizar las actividades estererasas, se evidenció que *A. destrudens* obtuvo su mayor actividad en el día 4 la cual decreció hasta tiempo 12 del experimento. Sin embargo, el comportamiento de *A. sydowii*-like fue completamente diferente, obteniéndose valores mínimos en el cuarto día hasta alcanzar su máxima actividad en tiempo 12.

Tabla 9. Valores de actividad enzimática lacasa (Lac.), peroxidasa (Perx.) y esterasa (Est.) las cepas *A. destrudens* y *A. sydowii* en medio sintético con HPAs a los 4-8 y 12 días.

Cepas	Tiempo 4			Tiempo 8			Tiempo 12		
	Actividad enzimática (UI/L)								
	Lac.	Perx.	Est.	Lac.	Perx.	Est.	Lac.	Perx.	Est.
<i>A. sydowii</i>	0,34 ± 0,03	0,93 ± 0,10	1,59 ± 0,18	0,49 ± 0,05	0,33 ± 0,00	3,10 ± 0,54	0,62 ± 0,05	0,42 ± 0,01	8,90 ± 0,66
<i>A. destrudens</i>	0,92 ± 0,17	9,30 ± 1,48	13,52 ± 1,76	2,89 ± 0,44	4,34 ± 0,84	11,60 ± 1,10	1,12 ± 0,45	4,52 ± 0,89	4,95 ± 1,19

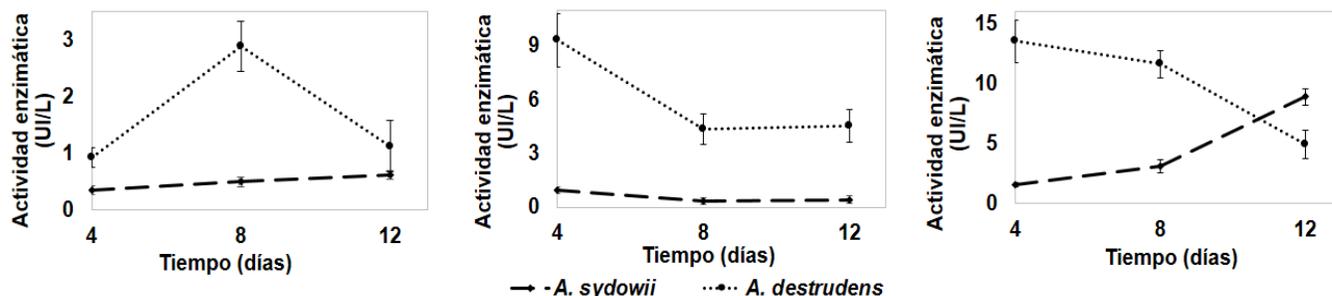


Figura 8. Valores de actividades enzimáticas lacasas (A), peroxidadas (B) y estererasas (C) de *A. sydowii*-like y *A. destrudens* en medio sintético con HPAs a los 4-8 y 12 días.

Para el caso de las actividades enzimáticas en aguas residuales reales (Figura 9 y Tabla 10), las actividades lacasas reportadas para ambas cepas tuvieron un comportamiento similar. El menor valor de actividad lacasa se obtuvo al cuarto día para ambas cepas y con el paso del tiempo esta fue aumentando hasta tiempo final del experimento, día 12. Los valores de actividades peroxidada obtenidos en ambas cepas incrementaron a partir del día 4 hasta

tiempo 12 para *A. sydowii*-like y para *A. destrudens*. Las actividades estererasas, también mostraron un comportamiento similar en ambas cepas, sin embargo, cabe destacar en este caso se evidenciaron valores mínimos de actividad estererasa en el octavo día para *A. sydowii*-like y para *A. destrudens*, mostrando sus máximos en tiempo 12.

Tabla 10. Valores de actividad enzimática lacasa (Lac.), peroxidasa (Perx.) y estererasa (Est.) las cepas *A. destrudens* y *A. sydowii* en aguas residuales reales a los 4-8 y 12 días.

Cepas	Tiempo 4			Tiempo 8			Tiempo 12		
	Actividad enzimática (UI/L)								
	Lac.	Perx.	Est.	Lac.	Perx.	Est.	Lac.	Perx.	Est.
<i>A. sydowii</i>	0,04 ± 0,02	0,15 ± 0,08	2,83 ± 0,73	1,17 ± 0,10	0,84 ± 0,17	1,97 ± 0,16	1,37 ± 0,15	0,93 ± 0,10	8,45 ± 1,27
<i>A. destrudens</i>	0,07 ± 0,06	0,34 ± 0,03	2,89 ± 0,57	0,35 ± 0,08	0,49 ± 0,05	1,52 ± 0,76	0,60 ± 0,10	0,62 ± 0,05	11,28 ± 1,32

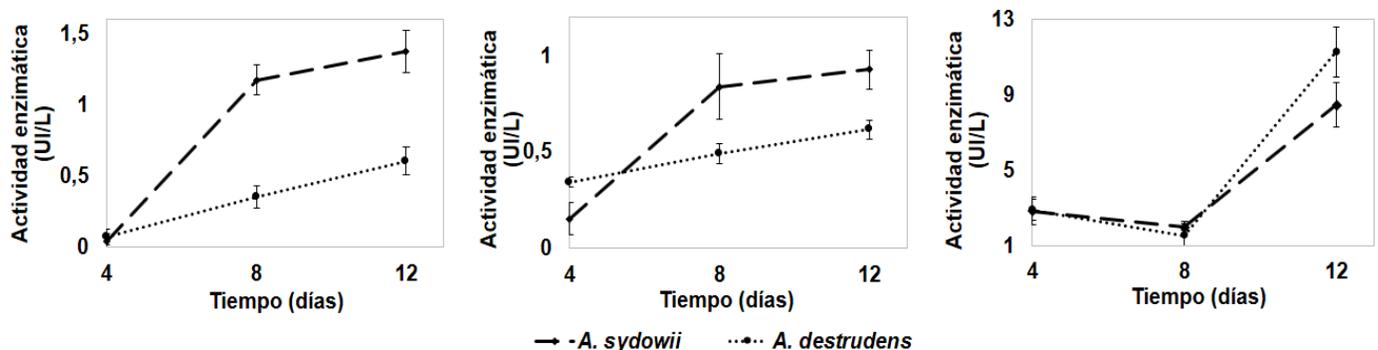


Figura 9. Valores de actividades enzimáticas lacasas (A), peroxidasas (B) y estererasas (C) de *A. sydowii*-like y *A. destrudens* en aguas residuales reales a los 4-8 y 12 días.

Reportes sobre *Neosartoria fischeri* (ascomiceto) mostraron que esta cepa es capaz de crecer en presencia de asfalteno e HPAs como indeno (1, 2, 3-cd) pireno, benzo (g, h, i) perileno y coroneno como única fuente de carbono en concentraciones de hasta 50 ppm iniciales. Esta cepa mostró ante estas condiciones baja actividad lacasa y ausencia de actividad peroxidasa. Este resultado corrobora lo reportado por Uribe-Alvarez y colaboradores en 2011, los cuales reportaron valores de actividad lacasa de 12.7 UI/L a las 7 semanas del experimento en *Neosartoria fischeri* (Hernández *et al.*, 2016). Este valor de actividad lacasa reportado se encuentra por encima de los valores obtenidos en *A. sydowii*-like y en *A. destrudens* al día 12 del experimento con HPAs. Zafra y colaboradores en 2015 reportaron que la cepa

Trichoderma asperellum H15 (ascomiceto) mostró actividades peroxidadas y lacasas, evidenciándose un aumento de la actividad lacasa en presencia de HPAs (fenantreno y pireno) en tiempo 4 y 8 del experimento (determinación cualitativa). Al comparar este resultado con el obtenido para las cepas en estudio en nuestro trabajo en presencia de aguas residuales reales, las cuales presentaban pireno y fenantreno, se observó que la mayor concentración de actividad lacasa se obtuvo en tiempo 12 tanto para *A. sydowii*-like, como para *A. destruens*. Existen reportes de *Phanerochaete chrysosporium* removiendo benzo (a) pireno mediante la excreción de peroxidadas (Liao *et al.*, 1997) y en 2002, Zheng y colaboradores reportaron a esta cepa con la capacidad de remover pireno, fenantreno y benzo (a) pireno mediante las enzimas ligninolíticas MnP, con valores reportados entre los 10–100 U/L. Al comparar estos valores con los obtenidos en nuestro trabajo, podemos evidenciar que *A. sydowii*-like y *A. destruens* mostraron valores menores de actividades peroxidadas totales en la remoción de HPAs. Cabe destacar que existen pocos reportes sobre la remoción de HPAs mediante enzimas estererasas, sin embargo, Sharma y colaboradores en 2016, reportaron al consorcio de *Serratia marcescens* L-11, *Streptomyces rochei* PAH-13 y *P. chrysosporium* VV-18 como cepas que remueven fluoreno, antraceno, fenantreno y pireno mediante la excreción de estererasas. Este dato pudiera sustentar las altas concentraciones de actividades estererasas presentes en nuestro experimento tanto para *A. sydowii*-like y *A. destruens*.

3.4.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas en medios sintéticos con compuestos farmacéuticos.

Los medios sintéticos con compuestos farmacéuticos inoculados con *A. sydowii*-like y *A. destruens* mostraron los siguientes comportamientos al determinar las actividades enzimáticas lacasas, estererasas y peroxidadas (Figura 10 y Tabla 11). Para el caso de las actividades lacasas se pudo evidenciar que *A. destruens* obtuvo su menor valor de actividad al día 1 y su máximo valor al séptimo día, evidenciándose un incremento en los valores de actividad al paso del tiempo. Sin embargo, para el caso de *A. sydowii*-like, el menor valor de actividad se obtuvo en tiempo 1 y su máximo al día 4. Las actividades peroxidadas mostraron un comportamiento similar en ambas cepas, obteniéndose su mínimo en tiempo 1 y su máximo al cuarto día. Las actividades estererasas obtenidas para *A. destruens* mostraron su

menor valor de actividad al cuarto día del experimento y el mayor a tiempo 7; sin embargo, *A. sydowii*-like mostró una curva decreciente de actividad, donde se obtuvo un máximo a tiempo 1 y su mínimo al séptimo día.

Tabla 11. Valores de actividad enzimática lacasa (Lac.), peroxidasa (Perx.) y esterasa (Est.) las cepas *A. destrudens* y *A. sydowii* en medios sintéticos con compuestos farmacéuticos a los 1, 4 y 7 días.

Cepas	Tiempo 1			Tiempo 4			Tiempo 7		
	Actividad enzimática (UI/L)								
	Lac.	Perx.	Est.	Lac.	Perx.	Est.	Lac.	Perx.	Est.
<i>A. sydowii</i>	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,01	7,76 ± 1,26	0,51 ± 0,16	0,53 ± 0,09	6,41 ± 1,06	0,21 ± 0,03	0,33 ± 0,06	3,24 ± 0,55
<i>A. destrudens</i>	0,21 ± 0,04	0,04 ± 0,02	5,45 ± 0,21	0,28 ± 0,08	0,66 ± 0,09	4,40 ± 0,84	1,65 ± 0,16	0,43 ± 0,02	17,27 ± 1,06

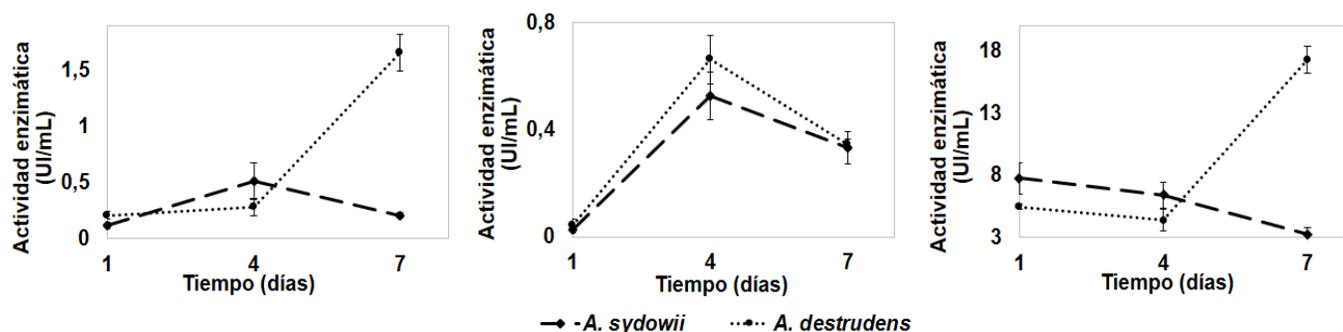


Figura 10. Valores de actividades enzimáticas lacasas (A), peroxidasas (B) y estereras (C) de *A. sydowii*-like y *A. destrudens* en medios sintéticos con compuestos farmacéuticos a los 1, 4 y 7 días.

Existen pocos estudios relacionados con la remoción de compuestos farmacéuticos mediante la utilización de enzimas extracelulares en ascomicetos. Hata y colaboradores en 2010, publicaron que *P. sordida* YK-624 es capaz de remover ácido mefenámico al paso de los 7 días del experimento, mostrando valores de lacasas, Mn-peroxidasas y Li-peroxidasas hasta 0.0003 UI/mL. Este valor es inferior a los obtenidos para las actividades lacasas y peroxidasas totales obtenidas en nuestro experimento al paso de los 7 días para ambas cepas. Al analizar los resultados obtenidos en nuestro experimento, cabe destacar la presencia de actividad enzimática extracelular ante compuestos farmacéuticos como única fuente de carbono, lo cual pudiera ser una alternativa para utilizar estas cepas en procesos de biorremediación.

Al comparar los porcentajes de remoción de los compuestos farmacéuticos con los valores de actividad enzimática encontradas para ambas cepas, podemos llegar a la conclusión que la remoción de estos compuestos no se llevó a cabo solamente mediante las enzimas extracelulares cuantificadas en este experimento. Es importante destacar que, para el caso de la degradación de compuestos farmacéuticos, existen de igual manera que para los HPAs, reportes de la actividad monooxigenasa del Cyt P-450. Esto nos permite pensar en la posibilidad de que la primera y mayor remoción de estos compuestos farmacéuticos se está llevando a cabo mediante algunos de los Cyt P-450 presentes.

3.5. Ensayos toxicológicos

Con el objetivo de corroborar la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos en medios sintéticos y aguas residuales, se llevaron a cabo ensayos toxicológicos con el fin de evaluar la toxicidad de estos xenobióticos en la germinación de *Cucumis sativa*.

Al analizar el comportamiento obtenido en la germinación de las semillas de pepino en presencia de benzo (a) pireno y fenantreno en medios sintéticos (Figura 11 y Tabla 12), se evidenció que las plántulas germinadas en los sobrenadantes tratados con *A. sydowii* - like a los 12 días del experimento mostraron mejores crecimientos que los tratados con *A. destrudens* al ser comparados con el control positivo (agua). *A. destrudens* no mostró diferencias significativas al ser comparada con el control negativo (sobrenadante sin inocular).

Tabla 12. Valores del crecimiento de las plántulas de pepino (mm) en presencia de los controles – y +, así como de los sobrenadantes a tiempo final del experimento (Tiempo 12) de los medios sintéticos con HPAs tratados con *A. sydowii* y *A. destrudens*.

Cepas	Tiempo 12	Control -	Control +
<i>A. sydowii</i>	7,70 ± 0,42	4,90 ± 0,13	7,30 ± 1,79
<i>A. destrudens</i>	5,00 ± 0,78		

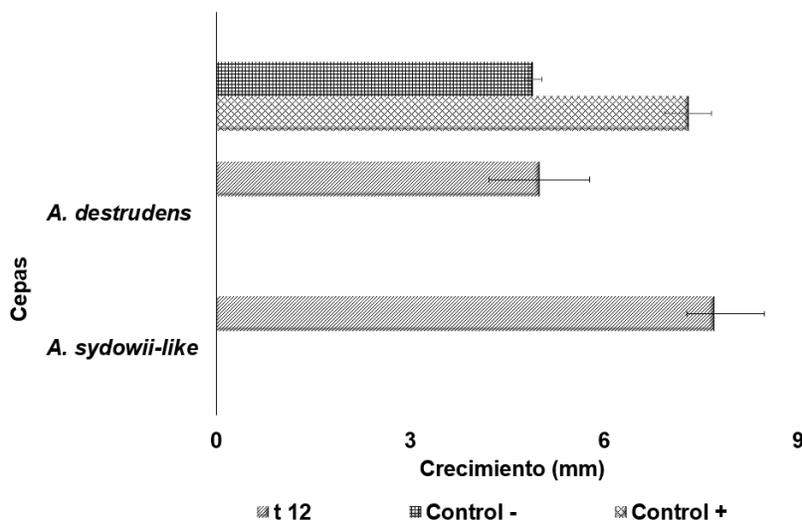


Figura 11. Ensayos toxicológicos en semillas de pepino con sobrenadantes de *A. sydowii-like* y *A. destrudens* a los 12 días del experimento con medios sintéticos con HPAs.

El crecimiento de las plántulas en presencia de aguas residuales reales (Figura 12 y Tabla 13), mostraron que las semillas crecidas en los sobrenadantes tratados con *A. destrudens* obtuvieron valores similares en tiempo 12 del experimento al ser comparada con el obtenido para el control positivo, no existiendo de este modo diferencias estadísticamente significativas. Al comparar este valor con el control negativo utilizado se obtuvieron diferencias estadísticas, aunque estas no fueron muy marcadas. Este resultado nos demuestra que los sobrenadantes tratados con esta cepa al paso de los 12 días presentaron una toxicidad similar a la inicial, debido a que las plántulas no mostraron un crecimiento razonable al compararlo con los porcentajes de remoción de HPAs obtenidos para este ensayo. La cepa *A. sydowii-like* por su parte, mostró diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las plántulas en tiempo 12 respecto al control positivo utilizado en este experimento. Este resultado nos proporciona que esta cepa es capaz de eliminar satisfactoriamente la toxicidad presente en estas aguas residuales reales y que los sobrenadantes resultantes de la cinética no producen metabolitos más tóxicos que los contaminantes degradados. De igual forma es importante destacar que los valores de crecimiento de las plántulas en aguas residuales reales fueron mayores que los obtenidos en los sobrenadantes de medios sintéticos con benzo (a) pireno y fenantreno. Este resultado pudiera deberse a la presencia en las aguas residuales de compuestos orgánicos que favorecieran el crecimiento de las plántulas.

Tabla 13. Valores del crecimiento de las plántulas de pepino (mm) en presencia de los controles – y +, así como de los sobrenadantes a tiempo final del experimento (Tiempo 12) de aguas residuales reales tratados con *A. sydowii* y *A. destrudens*.

Cepas	Tiempo 12	Control -	Control +
<i>A. sydowii</i>	32,18 ± 4,84	15,84 ± 5,29	20,59 ± 5,43
<i>A. destrudens</i>	19,60 ± 6,65		

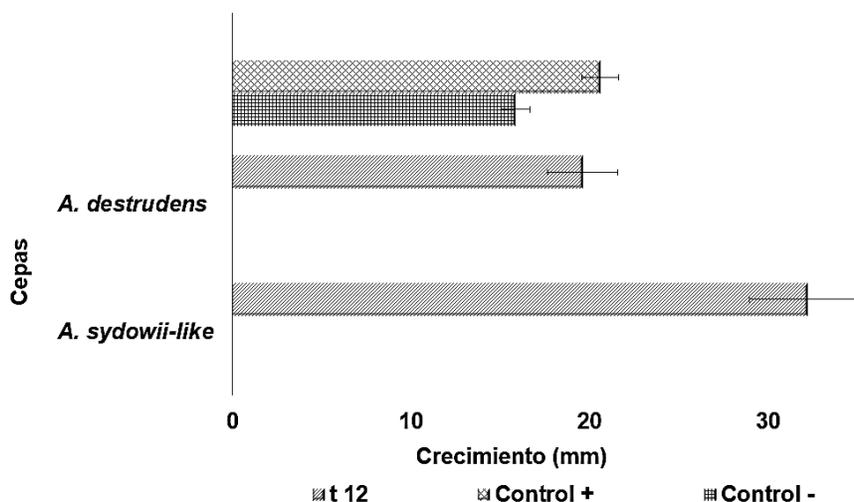


Figura 12. Ensayos toxicológicos en semillas de pepino con sobrenadantes de *A. sydowii*-like y *A. destrudens* a los 12 días del experimento con aguas residuales reales.

Los resultados obtenidos para el caso de las plántulas crecidas en presencia de los sobrenadantes de los compuestos farmacéuticos se muestran en la Figura 13 y Tabla 14. Se evidenció que las plántulas crecidas en presencia de los sobrenadantes obtenidos con *A. destrudens* mostraron diferencias estadísticamente significativas en tiempo 7 del experimento al ser comparadas con los controles negativos y positivos, evidenciando de este modo que *A. destrudens* es capaz de remover eficientemente los compuestos farmacéuticos presentes en el medio. *A. sydowii*-like por su parte, también mostró diferencias estadísticamente significativas en tiempo 7 del experimento al ser comparada con los controles utilizados, sin embargo, al observar los valores podemos inferir que los sobrenadantes obtenidos al paso de los 7 días seguían siendo tóxicos para las plántulas. Este comportamiento pudiera ser debido a una respuesta de adaptación homeostática, la cual se basa en el aumento de las defensas naturales de la planta (Calabrese y Baldwin, 2003) a las concentraciones de

compuestos farmacéuticos utilizados en este experimento. Este fenómeno conduce a una estimulación preliminar, pero al paso del tiempo estos compuestos se pueden volver tóxicos para la planta (Calabrese y Baldwin, 2003, Amendola *et al.*, 2006 y Baderna *et al.*, 2014).

Tabla 14. Valores del crecimiento de las plántulas de pepino (mm) en presencia de los controles – y +, así como de los sobrenadantes a tiempo final del experimento (Tiempo 7) de los medios sintéticos con compuestos farmacéuticos tratados con *A. sydowii* y *A. destrudens*.

Cepas	Tiempo 7	Control -	Control +
<i>A. sydowii</i>	91,70 ± 5,89	128,00 ± 0,14	153,00 ± 1,18
<i>A. destrudens</i>	178,00 ± 2,12		

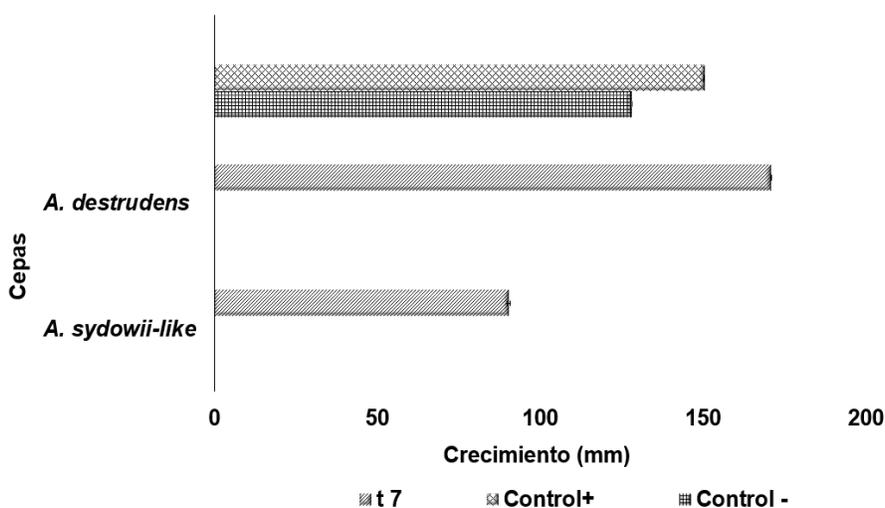


Figura 13. Ensayos toxicológicos en semillas de pepino con sobrenadantes de *A. sydowii-like* y *A. destrudens* a los 7 días del experimento con compuestos farmacéuticos.

Estudios previos realizados de germinación de semillas para el caso de plantas como berro hortelano (*Lepidium sativum*), soya verde (*Vigna radiata*), quimbombó (*Abelmoschus esculentus*) y pepino (*Cucumis sativus*) han demostrado la toxicidad de metales pesados como Cu, Mn, Cr, Ni y Zn en estas semillas (Visioli *et, al*, 2014 y Hussain *et, al*, 2015). El crecimiento de las plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) han sido también estudiados para la medición de la toxicidad por inhibición de derivados fenólicos sustituidos como el 2-Nitrofenol, 3-Nitrofenol, 2-Clorofenol, 4-Fluorofenol, entre otros (Wang *et, al*, 2002). También existen reportes en 2004 de Y.-J. An, en el cual se evaluó la toxicidad aguda en plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) ante bajos niveles de

una mezcla de tolueno, benceno, etilbenceno y xileno. Se evidenció de esta forma que la mezcla de xenobióticos provocó a largo plazo efectos adversos crónicos en esta planta. Cabe destacar que los resultados obtenidos en nuestro experimento nos demuestran que ambas cepas en estudio son capaces de eliminar del medio de cultivo tanto los compuestos farmacéuticos, como los HPAs utilizados. Sin embargo, el modelo utilizado para los ensayos toxicológicos en este caso no resultó ser el más adecuado, debido a que las plántulas germinaron en los controles negativos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio nos permitieron concluir que se cumplió la hipótesis mencionada, la cual plantea que, las cepas *Aspergillus sydowii*-like H1 y *Aspergillus destrudens* EXF-10411 serán capaces de degradar compuestos de naturaleza aromática (HPAs y farmacéuticos) en condiciones hipoersalinas. Basándonos en los resultados obtenidos podemos resumir que ambas cepas mostraron actividad enzimática (lacasa, peroxidasa y esterasa) en condiciones hipersalinas. De igual manera, ambas cepas mostraron ser eficientes en la remoción de HPAs y compuestos farmacéuticos.

PERSPECTIVAS

- Analizar el transcriptoma comparativo de *A. destrudens* en condiciones hipersalinas y en presencia de HPAs.
- Analizar la remoción de HPAs al inhibir los citocromos P 450 y las enzimas extracelulares (lacasas, esterasas y peroxidasas) presentes en las cepas *A. sydowii* – like y *A. destrudens* en condiciones hipersalinas y en presencia de HPAs.

Anexo perspectivas más amplias según exigencias del Posgrado en Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Anexo: Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo se describen a continuación, con el objetivo de llevar a cabo experimentos que permitan concluir algunas premisas evaluadas en este trabajo.

Objetivo general

Analizar intracelularmente los mecanismos de remoción de HPAs de las cepas *A. sydowii* – like y *A. destrudens* en condiciones hipersalinas.

Objetivos específicos

1. Analizar el transcriptoma comparativo de *A. destrudens* en condiciones hipersalinas y con la presencia de HPAs.
2. Analizar la inhibición de los citocromos P 450 de las cepas *A. sydowii* – like y *A. destrudens* en condiciones hipersalinas y en presencia de HPAs.

Justificación

Debido a la necesidad de llevar a cabo una investigación más profunda acerca de las cepas en estudio, se propone llevar a cabo la determinación de los mecanismos moleculares por los cuales estas cepas realizan la remoción de HPAs en condiciones hipersalinas. La realización de un transcriptoma comparativo en condiciones hipersalinas, tanto con HPAs como con glucosa, nos llevará a dilucidar a través de que vías los hongos halófilos degradan HPAs. Importante mencionar que ya existen estudios previos en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos de la UAEM (Peidro, 2018, Tesis de Maestría) en el cual se llevó a cabo el transcriptoma comparativo para el caso de *A. sydowii*-like, por lo que faltaría realizar el de *A. destrudens*. El objetivo de llevar a cabo esta técnica es que la misma nos permite determinar celularmente la información genética cifrada en el ADN y contenida en los genes expresados.

Al analizar los resultados obtenidos en esta investigación, nos lleva a pensar que existen otros mecanismos que se están activando en la célula para remover estos xenobióticos. De esta forma, surge la idea de realizar un estudio en el cual se inhiba el Citocromo P 450 (Cyt-P450) con el

objetivo de determinar si este es el causal o no de la elevada remoción de xenobióticos en lugar de ser las enzimas extracelulares excretadas por *A. sydowii*-like y *A. destruens*. Las enzimas del citocromo P450 (EC 1.14.14.1) son hemoproteínas que catalizan las reacciones de hidroxilación, epoxidación y monooxigenación, que son comunes en el metabolismo de xenobióticos. En los hongos, los Cyt P-450 desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis de metabolitos secundarios y ergosterol, la esporogénesis y en las reacciones catabólicas en la degradación de compuestos xenobióticos. Las mismas tiene la capacidad de igual forma de agregar átomos de oxígeno a los anillos de los HPAs, formando moléculas más solubles en agua, que posteriormente son excretadas (Goodsell, 2004). Recientemente, se ha explorado una divergencia a gran escala de los Cyt P-450 dentro del reino fúngico mediante estudios bioinformáticos (Doddapaneni *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2007; Intikhab *et al.*, 2007; Park, *et al.*, 2008). Además de los impactos biológicos de los Cyt P-450 fúngicos, es de gran interés utilizar sus funciones catalíticas en los procesos de biotecnología (B. Sutherland *et al.*, 1991; Ichinose *et al.* 1999; Guengerich 2002; Kasai *et al.*, 2009, 2010a).

Metodología

1. Transcriptoma comparativo de *A. destruens* en condiciones hipersalinas y en presencia de HPAs

1.1. Extracción del ARN total de *A. destruens*

Primeramente, se llevará a cabo la purificación de ARN mediante el método de Tri Reagent (SIGMA), seguido de la construcción de las bibliotecas; así como la secuenciación de ARNm mediante la técnica RNA Seq. Las bibliotecas se agruparán y por último, se analizará la calidad de las secuencias mediante el software FASTQC (Andrews, 2014).

1.2. Transcriptoma: ensamblaje de novo y anotación funcional

Se realizará el ensamblaje de novo de las secuencias mediante la utilización del software Trinity (Haas, 2013). Posteriormente, mediante BLAST se llevará a cabo la anotación de las secuencias ensambladas en la base de dato UniProt utilizando el software Blast2Go.

1.3. Análisis de los niveles de expresión y expresión diferencial

Los datos de expresión se normalizarán mediante el algoritmo RUVseq. Posteriormente, se analizará la expresión diferencial de los genes mediante la herramienta DESeq2.

1.4. Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas

Por último, se llevará a cabo la anotación de los términos de GO mediante el programa Blasr2GO y se obtendrán los gráficos correspondientes a las rutas y vías metabólicas en base a los términos correspondientes a las ontologías.

Validar por RT-qPCR el transcriptoma de los transcritos que se encuentran regulados positivos o negativos en las condiciones evaluadas.

2. Inhibición del Citocromo P 450 en condiciones hipersalinas de las cepas *A. sydowii*-like y *A. destrudens*

Se utilizarán proinóculos de ambas cepas, de las cuales se obtendrán 10 g de micelio en peso húmedo para cada cepa. Se dejará el micelio recuperar durante 24 horas y posteriormente se procederá a la inhibición de los citocromos. Se adicionarán 5 mM de cada inhibidor: ABT (aminobenzotiazol) y PB (piperonil butóxido). Se dejarán reaaccionar durante 72 horas y posteriormente se realizarán las mediciones de las actividades enzimáticas lacasa, esterasa y peroxidasa. Por último, se analizarán las muestras mediante HPLC (Marco-Urrea *et al.*, 2015; Zahmatkesh *et al.*, 2016).

Cronograma de actividades

Actividades	E	F	M	A	M	A	S	O	N
2018									
Preparación de los materiales						X			
Transcriptoma comparativo						X	X		
Procesamiento y análisis de datos	X	X						X	X
Participación en Taller de micorremediación								X	
Participación en el Congreso Internacional de Extremófilos									X
2019									
Inhibición del Citocromo P 450	X	X							
Procesamiento y análisis de datos			X	X	X				
Participación en congresos							X	X	
2020 - 2022									
Escritura de borrador de tesis	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Publicar un artículo científico								X	
Participación en congresos		X						X	
Presentación de Tesis Doctoral					X				

REFERENCIAS

A.K Haritash y C.P Kaushik. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Jornal of Hazardous materials*.

Abraham S. Covarrubias, García J. A. Berumen, Juan José Peña Cabriales (2015). Microorganisms role in the bioremediation of contaminated soils with heavy metals. Vol. 25 (NE-3) *Biología* octubre 2015.

Adriana Martínez–Prado, Ma. Elena Pérez–López, Joaquín Pinto–Espinoza, Blanca Amelia Gurrola–Nevárez y Ana Lilia OSORIO–RODRÍGUEZ. 2011. Bioremediation of hydrocarbon polluted soil using sewages sludge as alternative source of nutrients. *Rev. Int. Contam. Ambient* vol.27 no.3 México ago. 2011.

Agudo A. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Madrid: Secretaría de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT Federación de Industria 2010. Pág. 130. [citado abril de 2013]. Disponible en: <http://www.ugt.es/saludlaboral/Hidrocarburos.pdf>.

Aitken M.D., Stringfellow W.T., Nagel R.D., Kazunga C., Chen S.H., 1998. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, *Can. J. Microbiol.* 44 743–752.

Alonso Díaz, Alberto. 2016. «Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Volume 19, Issue 1, January–June 2016, Pages 54-67

Sharma Anamika, Shashi Bala Singh, Richa Sharma, Priyanka Chaudhary, Alok Kumar Pandey, Raunaq Ansari, Venugopal Vasudevan, Anju Arora, Surender Singh, Supradip Saha, Lata Nain. 2016. Enhanced biodegradation of HPAs by microbial consortium with different amendment and their fate in in-situ condition. *Journal of Environmental Management*.

Andrea Critto a, Silvia Torresan a, Elena Semenzin a,b, Silvio Giove c, Miranda Mesman d,A.J. Schouten d, M. Rutgers d, Antonio Marcomini. *Science of the Total Environment* 379 (2007) 16–33. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants.

Andrés Ricardo Izquierdo Romero, 2013. Biodegradación de HPAs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Tesis. Universidad de Barcelona.

Andrzej Majcherczyk, Christian Johannes, Aloys Hüttermann. 1998. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Laccase of *Trametes Versicolor*. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00199-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00199-3)Get rights and content

Antonio Rodríguez Fernández-Alba Pedro Letón García Roberto Rosal García Miriam Dorado Valiño Susana Villar Fernández Juana M. Sanz García. 2006. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. Colección coordinada por: Fundación para el conocimiento Madrid CEIM

Aranda, E. (2016). Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 1–8. doi:10.1016/j.copbio.2015.12.002.

Argumedo-Delira R, Alarcon A, Ferrera-Cerrato R, Almaraz JJ, Pena Cabriales JJ (2012) Tolerance and growth of 11 Trichoderma strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *J Environ Manag* 95(Suppl): S291–S299

Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M, Legge RL (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19:771–783

Atagana HI (2009) Biodegradation of HPAs by fungi in contaminated soil containing cadmium and nickel ions. *Afr J Biotechnol* 8:5780–5789

Balcázar-López, E., Méndez-Lorenzo, L. H., Batista-García, R. A., Esquivel-Naranjo, U., Ayala, M., Kumar, V. V., Savary, O., Cabana, H., Herrera-Estrella, A., and Folch-Mallol, J. L. (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLoS One* 11, e0147997. doi:10.1371/journal.pone.0147997.

Barba L. E., Becerra D., Angulo V., Salazar L. 2011. *Biodegradabilidad de aguas residuales agroindustriales fototratadas mediante catálisis heterogénea*.

Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztán-Hernández, K., Morales-Herrera, C., Rodríguez-Hernández, R., and Folch-Mallol, J. (2014). Characterization of Lignocellulolytic Activities from a Moderate Halophile Strain of *Aspergillus sydowii* Isolated from a Sugarcane Bagasse Fermentation. *PLoS One* 9, e105893. doi: 10.1371/journal.pone.0105893.

Batista-García, R. A., Vaidyanathan Vinoth Kumar, Arielle Ariste, Omar Eduardo Tovar-Herrera, Olivier Savary, Heidy Peidro-Guzman, Deborah Gonzalez-Abradelo, Stephen A. Jackson, Alan D.W. Dobson, María del Rayo Sanchez-Carbente, Jorge Luis Folch-Mallol, Roland Ledu, Hubert Cabana. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *Journal of Environmental Management* 198 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.010>.

Beatriz Pernía*, Jhonny Rafael Demey, Ysvic Inojosa, y Leopoldo Naranjo-Briceño. 2012. Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. Pernía B., Demey J.R., Inojosa Y., Naranjo-Briceño L. 2012. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 3(1):1-39

Benavides, J. et al., 2006. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), pp.82–90. Betancor L, Johnson GR, Luckarift HR, 2013. Stabilized laccases as heterogeneous bioelectrocatalysts. *ChemCatChem* 5:46–60. doi:10.1002/cctc.201200611

Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., and Krishan, D. (2015).

Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (HPAs) using rhizosphere technology. *Brazilian J. Microbiol.* 46, 7–21. doi:10.1590/S1517-838246120131354.

Bogan, B.W. and R.T. Lamar. 1995. Oneelectron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(7): 2631-2635.

Bogan, B.W. and R.T. Lamar. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 64(1): 5867-5882. 20115878 enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5): 1597-1603.

Bonugli-Santos, Rafaella C., Maria R. dos Santos Vasconcelos, Michel R. Z. Passarini, Gabriela A. L. Vieira, Viviane C. P. Lopes, Pedro H. Mainardi, Juliana A. dos Santos, Lidia de Azevedo Duarte, Igor V. R. Otero, Aline M. da Silva Yoshida, Valker A. Feitosa⁴, Adalberto Pessoa Jr and Lara D. Sette. 2015. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2015.00269.

Boyle D., C. Wiesner, A. Richardson, Factors affecting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi, *Soil Biol. Biochem.* 30 (7) (1998) 873– 882.

Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright and S.D. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228(4706): 1434-1436.

Bustamante Peralta, E. 2012. Comparación de la cinética de decoloración de índigo carmín utilizando diferentes sistemas de inmovilización de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor*. Tesis para obtener el grado de: Maestra en Biotecnología Aplicada. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada – Tlaxcala.

Cajthaml T., V. Pacakova, V. Sasek, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chem. Listy.* 95 (2001) 404.

Cambria MT, Minniti Z, Librando V, Cambria A (2008) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* and its laccase in the presence of redox mediators. *Appl Biochem Biotechnol* 149:1–8

Cameron, M.D., S. Timofeevski and S.D. Aust. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6): 751-758.

Carles Cruz-Morató, 2013 Biodegradation of pharmaceuticals by *Trametes versicolor*. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona.

Carlos Mastandrea¹, Carlos Chichizola¹, Beatriz Ludueña¹, Héctor Sánchez¹, Horacio Álvarez², Andrea Gutiérrez: 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquím. clín. latinoam.* v.39 n.1 La Plata ene./mar.

Carmine M. Pariante y Stafford L. Lightman, 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. Volume 31, Issue 9, p464-468, September.

Carrera, G., Fernández, P., Vilanova, R.M., Grimalt, J.O., 2001. Persistent organic pollutants in snow from European high mountain areas. *Atmospheric environment* 35, 245–254

Casieri Leonardo • Antonella Anastasi •Valeria Prigione • Giovanna Cristina Varese. 2010. Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-010-9466-9.

Cerniglia CE, Kelly DW, Freeman JP, Miller DW. 1986. Microbial metabolism of pyrene. *Chem Biol Interact* 57:203–16.

Cerniglia CE, Sutherland GR (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis KN (ed) *Handbook of hyClar E. Polycyclic Hydrocarbons*, Academic Press.

Cerniglia E., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation* 3: 351- 368, 1992.

Christian V., R. Shrivastava, D. Shukla, H.A. Modi and B.R. Vyas. 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology* 43(4): 301-312.

Claudia Milena Monroy, Andrea Carolina Cortés, Diana Mercedes Sicard, Helena Groot de Restrepo. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. *Biomédica* vol.25 no.3 Bogotá Sept. 2005.

Cleuvers M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*; 142:185-194)

Crane, M., M. Janssen, P. Matthiessen, S. Maund, G. Merrington & P. Whitehouse. 2010. Introduction. *In: Crane, M., P. Matthiessen, D. S. Maycock, G. Merrington & P. Whitehouse (Eds.). Derivation and use of environmental quality and human health standards for chemical substances in water and soil. CRCPress. Boca Raton, Florida.1-4.*

Cuervo-soto, L. I., Valdés-García, G., Batista-García, R., Balcazar-López, E., Lira-Ruan, V., Pastor, N., and Folch-Mallol, J. L. (2015). Identification of a novel carbohydrate esterase from *Bjerkandera adusta*: Structural and function predictions through bioinformatics analysis and molecular modeling. *Protein Struct. Funct. bioinformatic*, 1– 14. doi:10.1002/prot.24760.

Cynthia Lopez Montoya. 2011. Aplicación del ensayo cometa en la asignación del daño genómico por benzo[a]pireno en *Dunaliella tertiolecta*. T E S I S.

Daane L.L., Harjono I., Barns S.M., Launen L.A., Palleroni N.J., Haggblom M.M., 2002. HPAS-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 131–139.

David Tirado-Torres, Martha Gayosso Canales, Yolanda Marmolejo-Santillán, Claudia Romo-Gómez and Otilio Acevedo-Sandoval. 2016. Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* sp. ATCC38540 in Liquid Medium. *Academia Journal of Scientific Research* 4(10): 376-379, October 2016 DOI: 10.15413/ajsr.2016.0406 ISSN 2315-7712

Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part I. A multi-criteria-based system for the selection of ecotoxicological tests and ecological observations

E.L. Ghisalberti. 2000. *Lantana camara* L. Verbenaceae, *Fitoterapia* 71 (2000) 467–486.

Edgar Balcázar-López, Luz Helena Méndez-Lorenzo, Ramón Alberto Batista García, Ulises Esquivel-Naranjo, Marcela Ayala, Vaidyanathan VinothKumar, Olivier Savary, Hubert Cabana, Alfredo Herrera-Estrella, Jorge Luis Folch-Mallol. 2016. Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0147997 February 5, 2016

Ehlers GA, Rose PD (2005) Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. *Biores Technol* 96:1264–1275

Ernesto Simon, 2008. Los metales pesados en aguas residuales. Remtavares.

Escobar, J., 2002. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar ONU, ed., Santiago de Chile.

Esra B., 2016. Potential effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) in marine foods on human health: a critical review, *Journal Toxin Reviews*, Volume 35, Issue 3-4.

Fernández J.A., L. M. Henao, A.M. Pedroza-Rodríguez y B. Quevedo-Hidalgo. (2009): Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11(1)

Ferreira, V., D. Magalhaes, S. Kling, J. da Silva and E. Bon. 2000. N-demethylation of methylene blue by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* stoichiometric relation for H₂O₂ consumption. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84(86): 255-265.

Field, J.A. 1996. Biodegradation of chlorinated compounds by white rot fungi. pp. 159-204. In: Häggblom M. and I.D. Bossert (eds.). *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications*. Springer, New York. 481 p.

Fuchs, G., Boll, M. & Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), pp.803–816.

Furuhagen Sara, Liewenborg Birgitta, Gorokhova Elena, Breitholtz Magnus. 2014. Feeding activity and xenobiotics modulate oxidatíe status in *Daphnia magna*: implications for ecotoxicological testing. *Environmental Science and Technology* 48 (21). DOI: 10.1021/es5044722.

Gema Rodríguez-Trigo; Jan Paul Zock; Isabel Isidro Montes. 2007. La exposición a las mareas negras y sus efectos en la salud. Revisión. Volumen 43, Número 11,

Gerardo Vázquez-Gómez Julieta Rubio-Lightbourn Jesús Javier Espinosa-Aguirre. 2016. Artículo de revisión. Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. Action mechanisms of aryl hydrocarbon receptor in metabolism of benzo [a] pyrene and tumor development. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.02.006>

German Zafra y Diana V. Cortés-Espinosa 2015. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22:19426–19433 DOI 10.1007/s11356-015-5602-4

German Zafra, Angélica Moreno-Montaño, Ángel E. Absalón, Diana V. Cortés-Espinosa. 2015. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*. Volume 22, Issue 2, pp 1034-1042.

Giovanna Visioli, Federica D. Conti, Ciro Gardi, Cristina Menta, 2014. Germination and Root Elongation Bioassays in Six Different Plant Species for Testing Ni Contamination in Soil. *Bull Environ Contam Toxicol* (2014) 92:490–496 DOI 10.1007/s00128-013-1166-5

Gousmi, N., Sahmi, A., Li, H. Z., Poncin, S., Djebbar, R., and Bensadok, K. (2016). Purification and detoxification of petroleum refinery wastewater by electrochemical process. *Environ. Technol.*, 1–26. doi:10.1080/09593330.2016.1150349.

Gupta, S., Pathak, B. & Fulekar, M.H., 2015. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(2), pp.241–269.

Guzmán-Ruiz Clarena, 2014. APLICACION INDUSTRIAL DE LOS HALOFILOS Y ENFOQUE EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA. Publicado el 21 de oct. de 2014

Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky P, Ingerslev F, Holten H and Jorgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: A review. *Chemosphere*. 1998; 36:357-393.

Hammel, K.E., B. Kalyanaraman and T.K. Kirk. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *Journal of Biological Chemistry* 261: 16948-16952.

Haritash A.K., C.P. Kaushik, 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HPAs): A review, *Journal of Hazardous Materials* 169 1–15.

Haroune, L., Saibi, S., Bellenger, J.-P., and Cabana, H. (2014). Evaluation of the efficiency of *Trametes hirsuta* for the removal of multiple pharmaceutical compounds under low concentrations relevant to the environment. *Bioresour. Technol.* 171, 199– 202. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.036.

Hata T, Kawai S, Okamura H, Nishida T. (2010a). Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation* 21:681-689.

Hazen, T. C., Prince, R. C., and Mahmoudi, N. (2016). Marine Oil Biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/acs.est.5b03333.

Heipieper H. J., Martínez P. M., Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, pp 1563-1573.

Heitkamp, M.A., Franklin, W. & Cerniglia, C.E., 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), pp.2549–2555.

Helleberg H, Tornqvist M. A new approach for measuring protein adducts from benzo[a]pyrene diolepoxide by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000;14:1644-53.

Henkjan J, Verkade HJ, Tso P. Biophysics of intestinal luminal lipids. In: Mansbach CM. Intestinal lipid metabolism. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2001. p. 1-19.

Hernández-López, E.L., Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R., Vazquez-Duhalt, R., 2016. Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 10773–10784.

Hofrichter M., Schneibner K., Schneegab I., Fritzsche W., 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 399–404.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase MnP. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 454-466.

Hollert Henner y Keiter Steffen H, 2015. *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environmental Science and Pollution Research* 22(21) · September 2015. DOI: 10.1007/s11356-015-5362--1

Hussein A., Mona M., (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egyptian Journal of Petroleum* 25, 107–123.

Iheanacho, C.C, Okerentugba, P.O, Orji, F.A. and Ataikiru, T.L. 2014. Hydrocarbon degradation potentials of indigenous fungal isolates from a petroleum hydrocarbon contaminated soil in Sakpenwa community, Niger Delta. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology* (ISSN: 2315-5140) Vol. 3(1) pp. 006-011

Irwing M. Ramírez-Sánchez*, Polioptro Martínez-Austria, Marco A. Quiroz-Alfaro, Erick R. Bandala, 2015. Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnol. cienc. agua* vol.6 no.5 Jiutepec sep./oct. 2015

Jakszyn P, González CA. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:4296-303.

Ji K, Kim S, Jan S, Seo J, Lee S, Park Y, Choi K. Kho YL, Kim PG, Park J, Choi K. Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe? *Ecotoxicology.* 2012; 21(7):2031-2050.

Juhasz, A.L. & Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, pp.57–88.

Kamei I, Suhara H, Kondo R (2005) Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:358–366 Kretz-Rommel A, Boelst

Kanaly R., Bartha R., Watanabe K. and Harayama S. 2000. "Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (10): 4205-4211.

Kaushik C.P., Haritash A.K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) and environmental health, *Our Earth* 3 (3) 1–7.

Kennedy, D., S. Aust and A. Bumpus. 1990. Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. *Applied Environmental Microbiology* 56(8): 2347-2353

Khindaria, A., D.P. Barr and S.D. Aust. 1995. Lignin peroxidases can also oxidize manganese. *Biochemistry* 34(23): 7773-7779.

Kosjek T, Heath E, Kompare B. (2007). Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:1379- 1387.

Kraemer, R., Choudhury, K. & Kampa, E., 2001. Protecting water resources: Pollution prevention. Secretariat of the International.

Kümmerer K, Al-Ahmad A. Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Environ Sci Pollut Int.* 2010; 17(2): 486-496.

Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN. The Effects of Natural and Synthetic Steroid Estrogens in Relation to their Environmental Occurrence. *Crit Rev Toxicol.* 2002; 32(2):113-132.

Lee, H., Jang, Y., Choi, Y.S., Kim, M.J., Lee, J., Lee, H., Hong, J.H., Lee, Y.M., Kim, G.H.,

Kim, J.J., 2014. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of HPAs. *J. Microbiol. Methods* 97, 56e62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.007>.

Liao Wan-Li, Dyi-HwaTseng, Ying-Chieh Tsai and Shenq-Chyi Chang, 1997. Microbial removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Elsevier Science Ltd Printed in Oreal Britain 0273-1223197. *Wal. Sci. Tech.* Vol. 35. No.8, pp. 155-264.

Haroune Lounès, Sabrina Saibi, Hubert Cabana, and Jean-Philippe Bellenger, 2017. Intracellular Enzymes Contribution to the Biocatalytic Removal of Pharmaceuticals by *Trametes hirsute*. DOI:10.1021/acs.est.6b04409 *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, 897–904

Machín-Ramírez, C. et al., 2010. Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(7), pp.538–544.

Majeau J.A., S.K Brar y R.D. Tyagi. (2010): Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants”. *Bioresource Technol.* 101:2331-2350.

Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. (2010a). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials* 176:836-842.

Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74:765-772.

Martín Sánchez Eduard, Ordaz Zamora Cesar Augusto, 2013. Biorremediación de hidrocarburos: degradación microbiana de Benzo (a) pireno. Cajamarca, Julio de 2013. Tesis. Universidad Alas Peruanas.

Martínez-Martínez Mónica, Iván Lores, Carlina Peña-García, Rafael Bargiela, Dolores Reyes-Duarte, María-Eugenia Guazzaroni, Ana Isabel Peláez, Jesús Sánchez and Manuel Ferrer. 2014. Biochemical studies on a versatile esterase that is most catalytically active with polyaromatic esters. *Microbial Biotechnology*.

Martinkova, L., Kotik, M., Markova, E., and Homolka, L. (2016). Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere* 149, 373–382. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.01.022.

Maruthi A., 2013. *Aspergillus flavus*: A potential Bioremediator for oil contaminated soils, *European Journal of Sustainable Development* 2, 1, 57-66.

Matsubara M, Lynch JM, De Leij FAAM (2006) A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme Microb Technol* 39:1365–1372

McElroy, A.E., Farrington, J.W., Teal, J.M., 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U. (Ed.), *Metabolism of Polycyclic*

Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, USA.

Mendoza Cantu A, P. Ramirez Romero, I. J. Cuesta Zarco, L. Salazar Coria, A. S. Sobrino Figueroa & Y. Pica Granados. (2011). *Daphniamagna* (Strauss,1820) y *Pseudokirshneriella subcapitata* (Hindak, 1990) como herramientas bioanalíticas para la evaluación ecotoxicológica en países en desarrollo. Hidrobiológica. Enrevisión.

Meyer, V., Wu, B., Ram, A. (2011). Aspergillus as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechol Lett*, 469-476. *Environmental Technology*, 825-834.

Michel Batlouni 2009. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. Instituto Dante Pazzanese de Cardiología, São Paulo, SP – Brasil.

N. Balagurusamy (2005). Anaerobic bioremediation – an untapped potential. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* vol. 4 (2005) 273-287.

N. Hussain, Tasneem Abbasi, S.A. Abbasi, 2015. Vermicomposting eliminates the toxicity of Lantana (*Lantana camara*) and turns it into a plant friendly organic fertilizer. *Journal of Hazardous Materials*.

Naranjo-Briceno L, Perniam B, Guerra M. 2013. Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extraheavy crude oil. *Microb Biotechnol* 6:720–730. doi:10.1111/ 1751-7915.12067

Narayanan K, Chopade N, Raj PV, Subrahmanyam VM, Rao JV, 2013. Fungal chitinase production and its application in biowaste management. *J Sci Ind Res* 72:393–399

Narro ML, Cerniglia CE, Van Baalen C, Gibson DT. 1992. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl Microbiol Biotechnol*. 58(4):1351-1359.

National Toxicological Program (NTP), 2002. Tenth Report on Carcinogens. Report of the NTP on Carcinogens. National Academy Press, Washington, DC.

Navarro Andrés, José M Carmona y Xavier Font; 1996. Contaminación de suelos y aguas subterráneas por vertidos industriales. <https://www.researchgate.net/publication/39118548>

Neifar M, Maktouf S, Ghorbel RE, Jaouani A, Cherif A; 2015. Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. In: Gupta VK, Tuohy MG, O'Donovan A, Lohani M (eds) *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. Wiley, Hoboken, pp 245–268

Neus Roig a,b, Jordi Sierra a,c, Martí Nadal b, Esther Martí c, Pedro Navalón-Madrigal d, Marta Schuhmacher a,b, José L. Domingo. *Science of the Total Environment* 425 (2012) 99–109. *versión On-line* ISSN 1851-6114. *Acta bioquím. clín. latinoam.* v.39 n.1 La Plata ene./mar. 2005

Nigam PS (2013) Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological

applications. *Biomolecules* 3:597–611. doi: 10.3390/biom3030597.

Nikki Agrawal, Preeti Verma and Sushil Kumar Shahi. 2018. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump. *Agrawal et al. Bioresour. Bioprocess.* (2018) 5:11 <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0197-5>

NinaGunde-Cimerman^aJoseRamos^bAnaPlemenitaš. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*. Volume 113, Issue 11, November 2009, Pages 1231-1241. I. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>

Nizetto L, Lohmann R, Gioia R, Jahnke A, Temme C, Dachs J, Herckes P. 2008. HPAs in air and seawater along a north south Atlantic transect: trends, processes and possible sources. *Environ Sci Technol.* 42(5):1580-1585.

Nurdiani, D., Ito, M., Maruyama, T., Terahara, T., Mori, T., Ugawa, S., and Takeyama, H. (2015). Analysis of bacterial xylose isomerase gene diversity using gene-targeted metagenomics. *J Biosci Bioeng* 120, 174–180.

Nyholm, N., B.N. Jacobsen, B.M. Pedersen, O. Poulsen, A. Damborg and B. Schultz. 1992. Removal of organic micropollutants at Ppb levels in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions biodegradation. *Water Research* 26(3): 339-353.

Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJI, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. Diclofenac in residues as the cause of vulture's population decline in Pakistan. *Nature.* 2004; 427: 630-633.

Orliski R. Multipoint moss passive samples assessment of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: concentrations profile and distribution along Warsaw main streets. *Chemosphere.* 2002;48(2):181-186.

Osorio Echavarría Juliana, Ana Isabel Vidal Benavides, Juan Carlos Quintero Díaz, 2012. Decolorization of textile wastewater using the white rot fungi anamorph R1 of *Bjerkandera* sp. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* N.º 57 pp. 85-93.

Otero-Paternina, Angélica; Cruz-Casallas, Pablo E.; Velasco-Santamaría, Vohana M. 2013. Effect of the Hydrocarbon Phenanthrene on *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) Growth. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 18 n.º 1, 2013 87 - 98

Padros J, Pelletier E. In vivo formation of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide-plasma albumin adducts in fish. *Mar Environ Res.* 2000;50:347-51.

Passarini Michel R. Z., Sette Lara D., Rodrigues Marili V. N. 2011. Improved extraction method to evaluate the degradation of selected HPAs by marine fungi grown in fermentative medium. *J. Braz. Chem. Soc.* vol.22 no.3 São Paulo. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000300022>

Patnaik P., 1999. *A Comprehensive Guide to the Properties of Hazardous Chemical Substances*, 2nd ed., John Wiley & Sons Publishers.

Paul Walakira; James Okot-Okumu. 2011. Impact of Industrial Effluents on Water Quality of Streams in Nakawa-Ntinda, Uganda. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* June, 2011 Vol. 15 (2) 289 – 296

Pelkonen O, Nebert D.W. 1982. Metabolism of polycyclic hydrocarbon: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev.* 34(2):189-222.

Pépin JM. Impacts écotoxicologiques de certains médicaments dans l'environnement. Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement. Sherbrooke, Québec, Canada, 2006

Petit A. Karla, Colina L. José, Yegres E. Francisco, Moran G. Hector, Richard-Yegres Nicole. 2013. Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. *Revista QuímicaViva - Número 3.*

Providenti M.A., Lee H., Trevors J.T., 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds, *J. Ind. Microbiol.* 12 379–395.

Quesada Peñate I., Jáuregui Haza U.J, Wilhelm A-M y Delmas H; (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 40, No. 3.

Quintero Díaz J. Carlos, 2011. Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. *Pesticides Degradation by White Rot Fungi: A Review. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 64(1)5867-5882. 2011.

Quiroga Alonso J M, Quero-Pastor M J, Acevedo Merino A; 2015. Tratamientos avanzados para la eliminación de fármacos en aguas superficiales. *Rev. salud ambient.;*15(Espec. Congr.):12-64

Quiroz-Castañeda RE, Balcázar-López E, Dantán-González E, Martínez A, Folch-Mallol RamirezRomero, P and Mendoza Cantú A. (Comp.). (2007). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas, aguas, sedimentos y suelos. La experiencia en México. SEMARNAT-INE, México. 414p.

Repetto, Robert y Baliga, Sanjay S.: 1996. Los Plaguicidas y el Sistema Inmunológico: Riesgos para la Salud Pública. World Resources Institute.

Revista Petroquímica. Petróleo, Gas, Química & Energía (2016). ISSN: 2469-0139 Romero M.C., Cazau M.C., Giorgieri S., Arambarri A.M., 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream, *Environ. Pollut.* 101 355–359.

Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P, Pickup RW. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1722 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(9):3883-3890.

Rodarte Morales A. I. 2012. Degradation of pharmaceutical compounds by ligninolytic fungi. Tesis

Doctorales Grupo de Ingeniería Química y Bioprocesos Universidad de Santiago de Compostela

Rodríguez-Rodríguez CE, Marco-Urrea E, Caminal G. (2010a). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-HPase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology* 101:2259-2266.

Rodríguez-Rodríguez CE, Marco-Urrea E, Caminal G. (2010b). Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes. *Journal of Hazardous Materials* 179:1152-1155.

Schmidt SN, Christensen JH, Johnsen AR. 2010. Fungal HPAS-metabolites resist mineralization by soil microorganisms. *Environ Sci Technol* 44:1677–82.

Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W., Warshawsky D., 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII- 135, isolated from a former coal gasification site, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 13–19.

Sette, L., and Bonugli-Santos, R. (2013). Ligninolytic enzymes from marine-derived fungi: production and applications. In: *Marine Enzymes for Biocatalysis-Sources, Biocatalytic Characteristics and Bioprocesses of Marine Enzymes*. Chapter 15, pp403.427. Editor: Antonio Trincone. Woodhead Publishing. doi:10.1007/s00128-002- 0011-z.

Shafiani S and Malik A. Tolerance of pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater irrigated soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003; 19:897-901

Shemer H, Linden KG. DNA methylation analysis using CpG microarrays is impaired in benzopyrene exposed cells. *Water Res.* 2007; 41:853-61.

Shimada H, Oginuma M, Hara A, Imamura Y. 2004. 9,10-Phenanthrenequinone, a component of diesel exhaust particles, inhibits the reduction of 4-benzoylpyridine and all-trans-retinal and mediates superoxide formation through its redox cycling in pig heart. *Chem Res Toxicol.* 17(8):1145-1150.

Singh H. 2006. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. Wiley, New Jersey

Singh P, Raghukumar C, Parvatkar RR, Mascarenhas-Pereira MBL, 2013. Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Yeast* 30:93–101. doi:10.1002/yea.2943

Sinha A, Sinha R, Khare SK; 2014. Heavy metal bioremediation and nanoparticle synthesis by metallophiles. In: Parmar N, Singh A (eds) *Geomicrobiology and biogeochemistry, soil biology*. Springer, Berlin, pp 101–118

Solanas, A. M. 2009. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la zona no saturada del suelo*. Vol IX.

Song HG. 1999. Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 5:669–672

Stauffer, J., 2013. *The Water Crisis: Constructing solutions to freshwater pollution* 1ra ed. Earthscan Publications, ed., London.

Tam N.F.Y., Cuo. L. G, Yau W.Y., Wong Y.S., 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong, *Mar. Poll. Bull.* 42 316–324.

Tang L, Tang XY, Zhu YG, Zheng MH, Miao QL. 2005. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) in urban soils in Beijing, China. *Environ Int.* 31(6):822- 828.

Tisa, F., Davoody, M., Abdul Raman, A. A., and Daud, W. M. A. W. (2015). Degradation and Mineralization of Phenol Compounds with Goethite Catalyst and Mineralization Prediction Using Artificial Intelligence. *PLoS One* 10, e0119933. doi:10.1371/journal.pone.0119933.

Haroune L, Touahar, I. E., Ba, S., Bellenger, J. P., and Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 481, 90–99. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.132.

Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from HPAS-contaminated soil, *Can. J. Microbiol.* 41 470–476.

UNICHIM 1651. Determination of Root Germination and Elongation Inhibition in *Cucumis sativus* L. (Cucumber), *Lepidium sativum* L. (Garden cress), *Sorghum saccharatum* Moench (Broom-corn) as Short Term Chronic Toxicity Test; 2003 (in Italian).

Uribe-Alvarez Cristina, Marcela Ayala, Lucia Perezgasga, Leopoldo Naranjo, Héctor Urbina² and Rafael Vazquez-Duhalt, 2011. First evidence of mineralization of petroleum asphaltene by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology* (2011) 4(5), 663–672. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00269.x

Uzoamaka G, Floretta T, Florence M, 2009. Hydrocarbon Degradation Potentials of Indigenous Fungal Isolates from Petroleum Contaminated Soils. *Journal of Physical and Natural Sciences*, 31: 1-6.

Vaithanomsat P., W. Apiwatanapiwat, O. Petchoy, J. Chedchant. (2010): Production of Ligninolytic Enzymes by White-Rot Fungus *Datronia* sp. KAPI0039 and Their Application for Reactive Dye Removal. *Int. J. Chem. Eng.* ID: 162504.

Vázquez, D.R., D.W. Westlake and P.M. Fedorak. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology* 60(2): 459-466.

Verdin A, Sahraoui AL, Durand R (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int Biodeterior Biodegrad* 53:65–70

Victor Cesar Moreno-Ortiz, Juan Manuel Martínez-Núñez, Jaime Kravzov-Jinich, Luis Alberto Pérez-Hernández, Consuelo Moreno-Bonett, Marina Altagracia-Martínez División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente Rx synthetic medicines and their environmental impact. 2013. *Rev Mex Cienc Farm* 44 (4) 2013

Vives Ingrid, Grimalt Juan O., Guitart Raimon, 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, Num 3, septiembre de 2001. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) July 1, 2012

Vogel HJ (1956) A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet Bull* 13, 42–43.

Walter U., Beyer M., Klein J., Rehm H.J., 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 671–676.

Ward O.P., Singh A., Van Hamme J., 2003. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 260–270.

WHO, IARC. Monographs on the evaluation the carcinogenic risks to humans: some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon; 2010. Vol. 92.

Wu Yi-Rui, Teng-Teng He, Jing-Sheng Lun, Khalid Maskaoui, Tong-Wang Huang, Zhong Hu. 2009. Removal of Benzo (a) pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World J Microbiol Biotechnol* (2009) 25:1395–1401 DOI 10.1007/s11274-009-0026-2

Xueqing Li, Jiaming Xu, Renata Alves de Toledo, Hojae Shim. 2015. Enhanced removal of naproxen and carbamazepine from wastewater using a novel countercurrent seepage bioreactor immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile conditions. *Bioresource Technology*.

Y.-J. An, 2004. Toxicity of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Mixtures to *Sorghum bicolor* and *Cucumis sativus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2004) 72:1006–1011 © 2004 Springer-Verlag New York, LLC DOI: 10.1007/s00128-004-0343-y

Ye B., Siddiqi M.A., Maccubbin A.E., Kumar S., Sikka H.C., 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*, *Environ. Sci. Technol.* 30 136–142.

Zafra G, Absalon AE, Cortés-Espinosa DV (2015b) Morphological changes and growth of filamentous fungi in presence of high concentrations of HPAs. *Braz J Microbiol* 46:937–941

Zafra G, Moreno-Montano A, Absalon AE, Cortes-Espinosa DV (2015a) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ Sci Pollut*

Res 22: 1034–1042.

Zafra, G and Cortés-Espinosa D.V. (2014). Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for HPAS Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils. *Water Air Soil Pollut.* 225:1826 DOI 10.1007/s11270-013-1826-4

Zheng Zhongming, Jeffrey Philip Obbard, 2002. Removal of surfactant solubilized polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. *Journal of Biotechnology* 96 (2002) 241–249.