

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**FORMULACIÓN DE PELLETS DE HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA**  
***Anthracoxyllum discolor*: EFECTO DEL ALMACENAMIENTO**  
**SOBRE LA VIABILIDAD Y DEGRADACIÓN DE**  
**PENTACLOROFENOL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**KARINA LISSETTE ROMERO CARDENAS**

**TEMUCO – CHILE**  
**2011**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**FORMULACIÓN DE PELLETS DE HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA**  
***Anthracoxyllum discolor*: EFECTO DEL ALMACENAMIENTO**  
**SOBRE LA VIABILIDAD Y DEGRADACIÓN DE**  
**PENTACLOROFENOL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

KARINA LISSETTE ROMERO CARDENAS

PROFESOR GUIA: OLGA MARGARITA RUBILAR ARANEDA

TEMUCO – CHILE  
2011

**FORMULACIÓN DE PELLETS DE HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA**  
***Anthracophyllum discolor*: EFECTO DEL ALMACENAMIENTO**  
**SOBRE LA VIABILIDAD Y DEGRADACIÓN DE**  
**PENTACLOROFENOL**

PROFESOR GUIA : OLGA MARGARITA RUBILAR ARANEDA  
INGENIERO AMBIENTAL  
DR. CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES  
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESORES CONSEJEROS : M. CRISTINA DIEZ J.  
QUÍMICO LABORATORISTA  
Dr. CIENCIAS DE ALIMENTOS  
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

*Dedico esta tesis a mi familia  
Y en especial a mi abuelita  
Celanira Vargas Hernández (Q.E.P.D),  
Por su constante apoyo.*

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, le agradezco a Dios por estar siempre a mi lado, permitiéndome llegar a la instancia final de entrega de tesis y por acompañarme durante el proceso universitario.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Olga Rubilar por otorgarme la posibilidad de formar parte en este proyecto, por su dedicación, consejos, confianza y apoyo durante todo el proceso de realización de tesis.

Agradezco también al proyecto Fondecyt 11090255 por el financiamiento y recursos entregados para el desarrollo de esta tesis.

Además de agradecer a todas aquellas personas que me han entregado su apoyo en diferentes momentos de esta etapa. Quiero agradecer en particular a Geovanna Cofre, Claudia Beltrán, Daniella Campos y Marcela Díaz no sólo por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis, sino por su amistad durante todo nuestro paso por la universidad.

Un especial agradecimiento a mi familia, que sin duda ha sido el apoyo fundamental para seguir adelante en este proceso. A mis padres que han hecho siempre un gran esfuerzo por entregarme lo mejor y así permitir lograr alcanzar las metas que me he propuesto. A mis hermanos, cuñada y prima Carolina que han estado en cada momento junto a mí, haciéndome sentir que puedo lograr concretar mis sueños. Y a mis queridos sobrinos Nicole, Aylinne y Joaquín, quienes me han regalado cada fin de semana momentos de alegría, a través de una sonrisa, besos, y abrazos, mostrándome un gran cariño.

Agradezco a mi abuelo José Cárdenas por su ayuda durante este año de realización de tesis, y a mi abuelita Celanira Vargas (Q.E.P.D), por la preocupación constante que tuvo por mi bienestar durante el período universitario, hasta el último momento de su vida.

## INDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	12
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Antecedentes generales del pentaclorofenol (PCF)	15
3.2 Hongos de pudrición blanca	17
3.3 Mecanismos de degradación para contaminantes orgánicos por hongos de pudrición blanca	18
3.3.1 Lignina peroxidasa (LiP)	18
3.3.2 Manganese peroxidasa (MnP)	20
3.3.3 Lacasa	21
3.3.4 Degradación de pentaclorofenol por hongos de pudrición blanca	22
3.4 Crecimiento de los hongos de pudrición blanca en cultivo líquido	24
3.5 Inmovilización de hongos de pudrición blanca	25
3.6 Encapsulación de hongos de pudrición blanca en alginato de calcio	26
3.7 Técnicas de almacenamiento de hongos de pudrición blanca	27
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General	30
5.2 Objetivos específicos.	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31

6.1	Compuestos químicos	31
6.2	Microorganismo utilizado	31
6.3	Medios de cultivo	32
6.3.1	Cultivo de conservación de la cepa	32
6.3.2	Cultivo de mantenimiento	32
6.3.3	Cultivo de crecimiento	33
6.3.4	Cultivo Kirk modificado	34
6.4	Ensayos	35
6.4.1	Efecto de la concentración de soportes sobre la inmovilización de <i>A. discolor</i>	35
6.4.2	Efecto de la concentración de alginato de calcio sobre la morfología y el potencial ligninolítico del hongo <i>A. discolor</i>	35
6.4.3	Degradación de PCF por el pellet de <i>A. discolor</i> inmovilizado en la mezcla de soporte y encapsulado en alginato de calcio	36
6.4.4	Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad del pellet <i>A. discolor</i>	36
6.4.5	Efecto de la deshidratación del pellet como una forma de almacenamiento sobre la viabilidad del hongo y la degradación de PCF	37
6.5	Metodología analítica	38
6.5.1	Microscopía electrónica de barrido	38
6.5.2	Cuantificación de PCF por HPLC	38
7.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
7.1	Efecto de la concentración de soportes sobre la inmovilización de <i>A. discolor</i>	40
7.2	Efecto de la concentración de alginato de calcio sobre la morfología y el potencial ligninolítico del hongo <i>A. discolor</i>	43
7.2.1	Efecto en la morfología del hongo	43

7.2.2	Efecto en el potencial ligninolítico del hongo	45
7.3	Degradación de PCF por el pellet de <i>A. discolor</i> inmovilizado en la mezcla de soporte y encapsulado en alginato de calcio	47
7.4	Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad del pellet <i>A. discolor</i>	49
7.5	Efecto de la deshidratación del pellet como una forma de almacenamiento sobre la viabilidad del hongo y la degradación de PCF	51
8.	CONCLUSIONES	55
9.	LITERATURA CITADA	56
10.	ANEXOS	64

## 1. RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca se han utilizado eficientemente en la degradación de diversos compuestos orgánicos contaminantes. Sin embargo, la preservación de estos ha sido poco estudiada, lo que ha significado un factor limitante para su manejo y transporte. En este contexto, el objetivo de este estudio fue desarrollar pellets del hongo de pudrición blanca *Anthracoxyllum discolor*, con características físicas y biológicas que permitan mantener su potencial de degradación durante condiciones de almacenamiento y su posterior uso en la degradación de Pentaclorofenol (PCF). Para ello se evaluó el efecto de la concentración de una mezcla de soportes, compuesta por carbón activado y aserrín sobre la inmovilización del inóculo de *A. discolor*. Además se evaluó el efecto de la encapsulación del pellet en alginato de calcio al 3 y 4% p/v sobre el potencial ligninolítico del pellet y la degradación de PCF. Asimismo, se evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento y la deshidratación sobre la viabilidad del pellet formulado.

La metodología desarrollada para realizar esta investigación consistió en la formulación de un pellet de *A. discolor* inmovilizado en diferentes concentraciones de una mezcla de soportes constituidas por carbón activado y aserrín (0,05; 0,1; 0,15; 0,3 y 0,5 g/L de cada tipo de soporte), del cual se seleccionó la concentración de soportes que mostró una mayor eficiencia de inmovilización y una morfología regular. Posteriormente, los pellets fueron recubiertos con 3 y 4% p/v de alginato de calcio, seleccionándose la concentración que presentó una mayor viabilidad de los pellets. El pellet seleccionado fue almacenado en viales con agua destilada estéril a temperaturas de 4 y 20°C durante 80 días. Paralelamente, los pellets fueron deshidratados en una estufa a 30°C y luego mantenidos a 4°C durante 80 días en viales herméticos. En ambos casos se evaluó el potencial ligninolítico por decoloración de Azul de Remazol Brillante (ARB) y su morfología por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Los resultados de la investigación demostraron que la composición de la mezcla de soportes afectó la morfología y el tamaño del pellet, siendo la aplicación de la mezcla de soportes a una concentración de 0,15 g/L de carbón activado y 0,15 g/L de aserrín la que presentó una mayor eficiencia de inmovilización. En cuanto a la encapsulación del pellet con alginato de calcio se demostró que a una concentración de 3% p/v de alginato de calcio se observó una mayor actividad ligninolítica del hongo. Asimismo, la encapsulación del pellet con 3% p/v no afectó la degradación de PCF por medio del hongo *A. discolor*, por lo cual la formulación del pellets es susceptible de ser utilizado como un método de almacenamiento del hongo de pudrición blanca *A. discolor*. En este mismo contexto, la temperatura de almacenamiento afectó la viabilidad de los hongos, siendo la temperatura de 4°C la que permite mantener la capacidad ligninolítica de los hongos por un periodo más prolongado. Finalmente, La deshidratación de pellets de hongos de pudrición blanca inmovilizados en una mezcla de soportes y encapsulados con 3% p/v de alginato de calcio mantiene su viabilidad y potencial de degradación durante 50 días de almacenamiento, formulación que podría ser relevante en la implementación de un proceso biotecnológico de degradación de contaminantes.

## SUMMARY

White rot fungi have been used efficiently in the degradation of various organic compounds contaminants. However, the preservation of these has been little studied, which has meant a limiting factor for its handling and transportation. In this context, the objective of this study was to develop pellets of white rot fungus *Anthracoxyllum discolor*, physical and biological features that will maintain the potential for degradation during storage conditions and its subsequent use in the degradation of pentachlorophenol (PCP). We evaluated the effect of the concentration of a mixture of media, consisting of activated charcoal and sawdust on the immobilization of the inoculum of *A. discolor*. Also evaluated the effect of encapsulation in calcium alginate pellets at 3 and 4% w / v of the potential ligninolytic the pellet and the degradation of PCP. Also evaluated the effect of storage temperature and dehydration on the viability of the pellet formulation.

The methodology developed for this research was the development of a pellet of *A. discolor* immobilized in different concentrations of a mixture of supports constituted by activated charcoal and sawdust (0.05, 0.1, 0.15, 0.3 and 0.5 g L<sup>-1</sup> of each type of support), which was selected the concentration of media that showed a higher efficiency of immobilization and a regular morphology. Subsequently, the pellets were coated with 3 to 4% w / v calcium alginate, selecting the concentration which showed a higher viability of the pellets. The pellet was stored in vials selected with sterile distilled water at temperatures of 4 and 20°C for 80 days. Similarly, the pellets were dried in an oven at 30°C and then kept at 4°C for 80 days in sealed vials. In both cases we evaluated the potential for discoloration ligninolytic Remazol Brilliant Blue (ARB) and morphology using Scanning Electron Microscopy (SEM).

The results of the investigation showed that the composition of the mixture of supports affect the morphology and size of the pellet, with the application of the mixture of media at a concentration of 0.15 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal and 0.15 g L<sup>-1</sup> of sawdust that had a higher efficiency of immobilization. With regard to encapsulation of calcium alginate pellet showed that a concentration of 3% w/v calcium alginate had higher activity ligninolytic fungus. Also, encapsulation of the pellet with 3% w/v did not affect the degradation of PCP by the fungus *A.*

*discolor*, whereby the pellet formulation is capable of being used as a method of storing the white rot fungus *A. discolor*. In this context, the storage temperature affected the viability of fungi, the temperature of 4 ° C which allows to maintain the ability of fungal ligninolytic for a longer period. Finally, dehydration pellet white rot fungi immobilized in a mixture of substrates and encapsulated with 3% w/v calcium alginate maintains their viability and potential degradation during 50 days of storage, a formulation which could be relevant to the implementation of a biotechnological process of degradation of contaminants.

## 2. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos naturales más fundamentales, tanto para el medio ambiente como para el ser humano. Un tema importante hoy en día es la progresiva contaminación que ha afectado en gran medida a este recurso, lo que ha generado conciencia en cuanto a su preservación y recuperación. Estudios que generen alternativas para remediar aguas contaminadas y así permitir su utilización, son algunos de los temas propuestos y desarrollados por diversos grupos de investigación, con el fin de generar soluciones viables que permitan la degradación de contaminantes orgánicos que se encuentren presentes en el agua.

Uno de los contaminantes orgánicos que ha generado un gran impacto en el medio ambiente, es el pentaclorofenol (PCF), el cual ha sido utilizado principalmente como fungicida para la preservación de la madera. El PCF es un compuesto tóxico para la mayoría de los sistemas biológicos, además es recalcitrante, por lo que se acumula en el medio ambiente y es difícil su eliminación.

Para la remoción de estos compuestos de aguas residuales se han utilizado principalmente métodos físico-químicos, tales como procesos de adsorción (Leyva-Ramo *et al.*, 2009). Sin embargo, son procesos de elevado costo y de baja eficiencia (Robinson *et al.*, 2001). En este aspecto, la biodegradación resulta ser una alternativa viable para la remoción de PCF en aguas residuales debido a que son métodos simples, económicamente viables y con elevada eficiencia de remoción.

Los organismos que presentan una mayor capacidad de degradar PCF son los hongos filamentosos, como los *basidiomicetos*, siendo los más estudiados los pertenecientes al grupo de hongos de pudrición blanca, también llamados hongos ligninolíticos (Mileski *et al.*, 1988; Alleman *et al.*, 1992). La capacidad de estos hongos para degradar contaminantes ha sido

atribuida principalmente a la acción de un sistema enzimático ligninolítico extracelular e inespecífico, compuesto por las enzimas lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) (Heinzkill *et al.*, 1998).

Para un desarrollo eficiente de un tratamiento de aguas residuales con hongos de pudrición blanca se requiere obtener un inóculo apropiado con características físicas y biológicas que puedan proteger al hongo frente a diversas condiciones ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, la producción de proteasas y la competencia con otros microorganismos de las aguas residuales. Éstas condiciones pueden cambiar la morfología y ruptura de los pellets de hongos disminuyendo su eficiencia de degradación de contaminantes (Eichlerova *et al.*, 2000). En este contexto, para reducir este efecto se ha demostrado el uso de soportes, los que pueden proporcionar una función estructural y nutricional a los hongos de pudrición blanca (Lestan y Lamar, 1996; Fomina y Gadd, 2002; Moredo *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2004; Rubilar *et al.*, 2007 a, b). Ortega-Clemente *et al.*, (2007) demostraron que hongos inmovilizados en aserrín y carbón activado son más estables y eficientes en la degradación de contaminantes orgánicos de aguas residuales en comparación a hongos no inmovilizados.

La inmovilización de hongos filamentosos presenta varias ventajas en comparación con el uso de células dispersas, entre estas se encuentra la fácil separación celular del medio líquido, además de que los cultivos se vuelven menos viscosos lo que conlleva a una mejor transferencia de masa (Wang *et al.*, 2005).

En este mismo sentido, otra forma de proteger la biomasa fúngica es mediante la encapsulación en alginato de calcio. El alginato de calcio proporciona resistencia mecánica, protección y estabilidad del hongo frente a condiciones de estrés (agitación) y competencia con otros microorganismos, entre otros (Loomis *et al.*, 1997; Arica *et al.*, 2001; Zhanga *et al.*, 2008).

Aunque la protección y la estabilidad ligninolítica de los hongos han sido ampliamente estudiadas, se ha demostrado que una de las grandes deficiencias al utilizar este tipo de organismos es obtener una metodología adecuada de preservación y almacenamiento del inóculo previo a su uso. Una adecuada metodología de almacenamiento debe mantener la viabilidad y características fisiológicas y morfológicas estables del inóculo durante un periodo establecido. Entre los principales parámetros que afectan la viabilidad del hongo, es el tiempo de almacenamiento, la temperatura, el medio líquido de almacenamiento y la humedad, entre otros (Cassidy *et al.*, 1996).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue desarrollar un inóculo de hongo de pudrición blanca con características físicas y biológicas adecuadas para mantener su potencial de degradación durante el almacenamiento y posterior aplicación en la degradación de PCF. Para el desarrollo de la investigación se utilizó el hongo *Anthracoxyllum discolor*, cepa aislada de bosques del sur de Chile y que ha demostrado un elevado potencial para la degradación de compuestos orgánicos contaminantes. Se desarrolló un pellet inmovilizado en una mezcla de carbón activado y aserrín el que fue encapsulado en alginato de calcio. Los pellets fueron almacenados en medio líquido a diferentes temperaturas, en el cuál fue evaluada la viabilidad en el tiempo. Además se evaluó el efecto de la deshidratación de pellets sobre la viabilidad del hongo y la degradación de PCF.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Antecedentes generales del pentaclorofenol (PCF)

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

El PCF es un compuesto lipofílico, persistente y acumulable y está considerado como uno de los contaminantes orgánicos prioritarios desde 1977 (USEPA, 1979). El PCF causa un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que es un proceso básico de la respiración, su toxicidad no es específica por lo que se le considera biocida.

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

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

**Cuadro 1.** Propiedades físico/química del Pentaclorofenol. Adaptado de (Shiu *et al.*, 1994).

<b>Características</b>	<b>Pentaclorofenol</b>
PM (g/mol)	266,3
Log K <sub>ow</sub>	5,05
Solubilidad en agua	14 mg/L (25 °C)
Punto de fusión	190 - 191 °C
Punto de ebullición	~ 309 - 310 °C
Presión de vapor (Pa)	0.0042 (25°C)
Constante de Henry (Pa m <sup>3</sup> /mol) <sup>a</sup>	0,079

<sup>a</sup> 760 mmHg, la constante de Henry fue calculada como la razón de vapor/solubilidad en agua a pH donde el PCF está en su forma molecular en solución acuosa.

### 3.2 Hongos de pudrición blanca

Los hongos de pudrición blanca son del tipo *basidiomicetos* (Eaton y Hale, 1993). Su nombre se deriva a partir de la apariencia que deja en la madera en la que se encuentra, proceso en el cual la eliminación de la lignina da un aspecto blanquecino a la madera (Pointing, 2001).

Los hongos de pudrición blanca se han utilizado con eficiencia en la degradación de algunos compuestos orgánicos contaminantes de diferente naturaleza química, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilo, pentaclorofenol y varios grupos de plaguicidas (Arisoy *et al.*, 1998; Bending *et al.*, 2002; Tortella *et al.*, 2005; Rubilar *et al.*, 2008; Acevedo *et al.*, 2011).

Los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Bjerkandera adusta* son los más estudiados para la degradación de PCF (Reddy *et al.*, 2000; Rubilar *et al.*, 2007; Tuomela *et al.*, 1999). Sin embargo, diversos estudios (Sato *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004) han estado orientados a estudiar cepas nativas de diferentes lugares con el objetivo de ser usadas en el mismo lugar de recolección sin afectar el ecosistema. En este contexto, estudios realizados con el hongo *Anthracoxyllum discolor* (Figura 1), una cepa nativa aislada desde bosques templados del sur de Chile ha demostrado una alta capacidad para degradar PCF, debido principalmente a su elevada producción de la enzima MnP (Rubilar *et al.*, 2007; Tortella *et al.*, 2008).



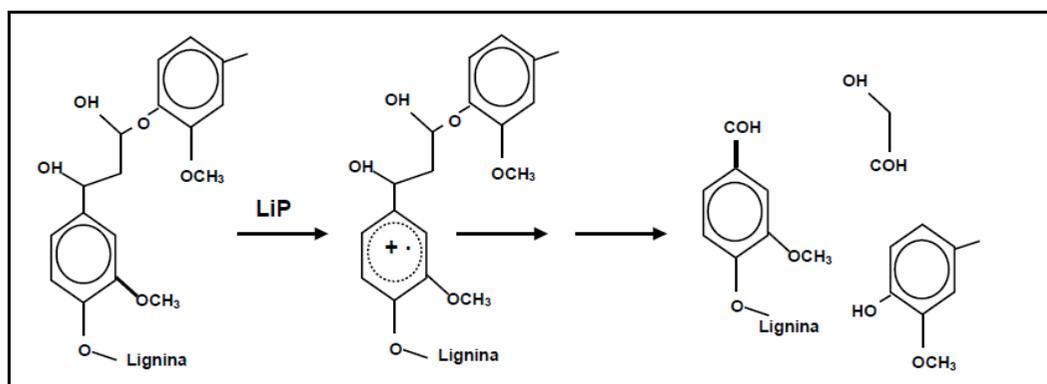
**Figura 1.** Hongo de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor*

### **3.3 Mecanismos de degradación para contaminantes orgánicos por hongos de pudrición blanca**

La capacidad en la degradación de contaminantes de los hongos de pudrición blanca es generalmente atribuida a un sistema enzimático extracelular no específico degradante de lignina, compuesto por lacasa (EC 1.10.3.2), lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.10.14) y manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13) (Heinzkill *et al.*, 1998).

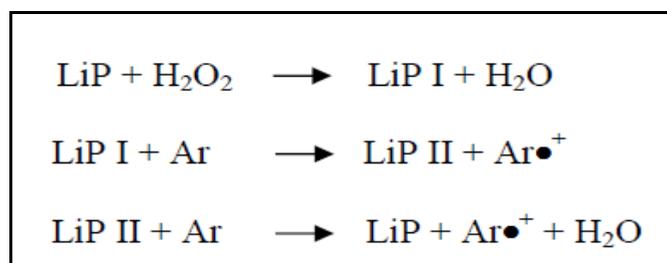
**3.3.1 Lignina peroxidasa (LiP).** Esta enzima pertenece a una familia de oxidasas multicobre con una amplia gama de sustratos reducidos (Leonowicz *et al.*, 2001). Esta enzima es una hemoproteína extracelular, dependiente del  $H_2O_2$  con un elevado potencial redox y un bajo pH óptimo (2,5), el que es controlado aparentemente por su ciclo catalítico (Gold y Alic, 1993). Por otra parte, la LiP es un fuerte oxidante y no solamente oxida los usuales sustratos de las peroxidases tales como, fenoles y anilinas, sino que también una variedad de estructuras no-fenólicas y éteres aromáticos que se asemejan a las unidades estructurales básicas de la lignina (Tuor *et al.*, 1992). La oxidación de alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibenzil alcohol) dependiente de  $H_2O_2$  a veratraldehído es la base para los ensayos estándares usados para detectar LiP en cultivos fúngicos (Tien y Kirk, 1988).

La oxidación catalizada por LiP, comienza con la extracción de un electrón desde el anillo aromático de un sustrato donador y la especie resultante experimenta una variedad de reacciones post enzimáticas (Kirk y Farrel, 1987) (Figura 2). Por lo tanto, la LiP se considera un agente ligninolítico importante, que puede reaccionar con otros oxidantes de menor tamaño que pueden penetrar y abrir la pared celular de la madera.



**Figura 2.** Rompimiento de una estructura no fenólica recalcitrante de la lignina, mediante la acción de la enzima LiP (Adaptado de Hammel (1996))

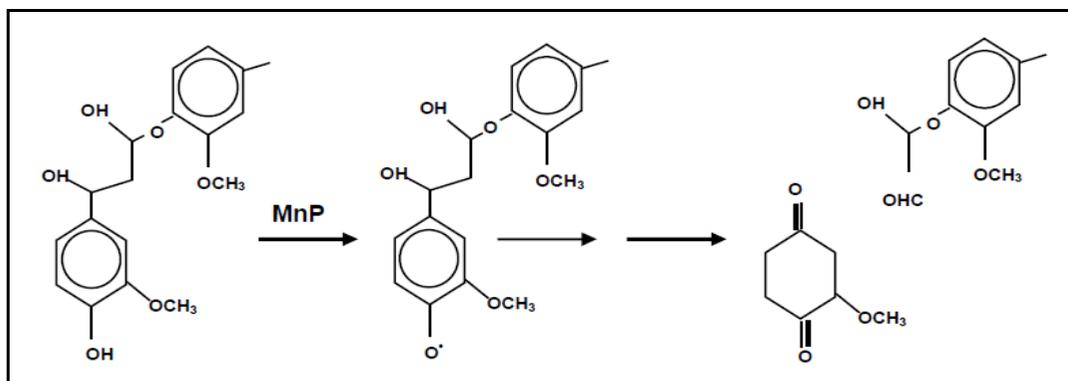
La interacción de LiP con un sustrato es mediante un mecanismo ping-pong, donde el  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida la enzima a través de dos electrones para obtener LiP I. Posteriormente, LiP I oxida sustratos aromáticos (Ar) por un electrón para obtener LiP II, la que es oxidada nuevamente por el sustrato aromático para llegar a su estado original (Figura 3) (Cullen y Kersten, 2004).



**Figura 3.** Ciclo catalítico de la enzima LiP

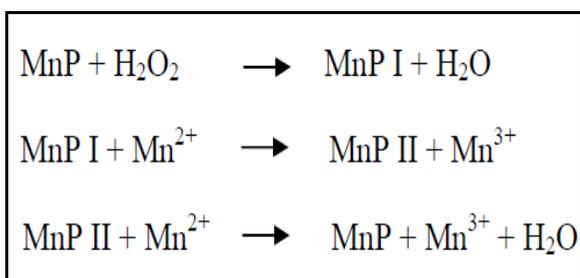
**3.3.2 Manganeso peroxidasa (MnP).** Es una proteína hemo capaz de oxidar Mn (II) a Mn (III), que a su vez, si está adecuadamente quelado, puede actuar como una especie libremente difusible que actúan sobre algunos de los compuestos fenólicos y no fenólicos (Hofrichter, 2002).

La principal función de la enzima MnP es la oxidación de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , usando  $H_2O_2$  como oxidante (Paszczynski *et al.*, 1992). Esta reacción requiere la presencia de un ácido orgánico quelante bidentado tales como, glicolato u oxalato, de modo que estabilicen el  $Mn^{3+}$  y promueven la acción de la enzima (Rodakiewicz-Nowak, 2000). El  $Mn^{3+}$  es un oxidante débil, por lo que es incapaz de atacar las estructuras recalcitrantes no – fenólicas de la lignina. Sin embargo, el  $Mn^{3+}$  oxida las estructuras fenólicas más reactivas que componen aproximadamente el 10% de la lignina. Estas reacciones dan lugar a un limitado grado de ligninólisis y otras reacciones degradativas (Figura 4) (Tuor *et al.*, 1992).



**Figura 4.** Rompimiento de una estructura fenólica terminal de la lignina, por oxidación de la enzima MnP (Adaptado de Hammel (1996))

Como se mencionó anteriormente, la oxidación de la lignina por acción de la enzima MnP, es dependiente del ión Mn. El primer sustrato reducido en el ciclo catalítico de MnP es  $Mn^{2+}$  (Figura 5). Luego, el  $Mn^{2+}$  reduce ambos estados de la enzima, MnP I y MnP II, generando  $Mn^{3+}$  el que posteriormente oxida el sustrato orgánico.



**Figura 5.** Ciclo catalítico de la enzima MnP

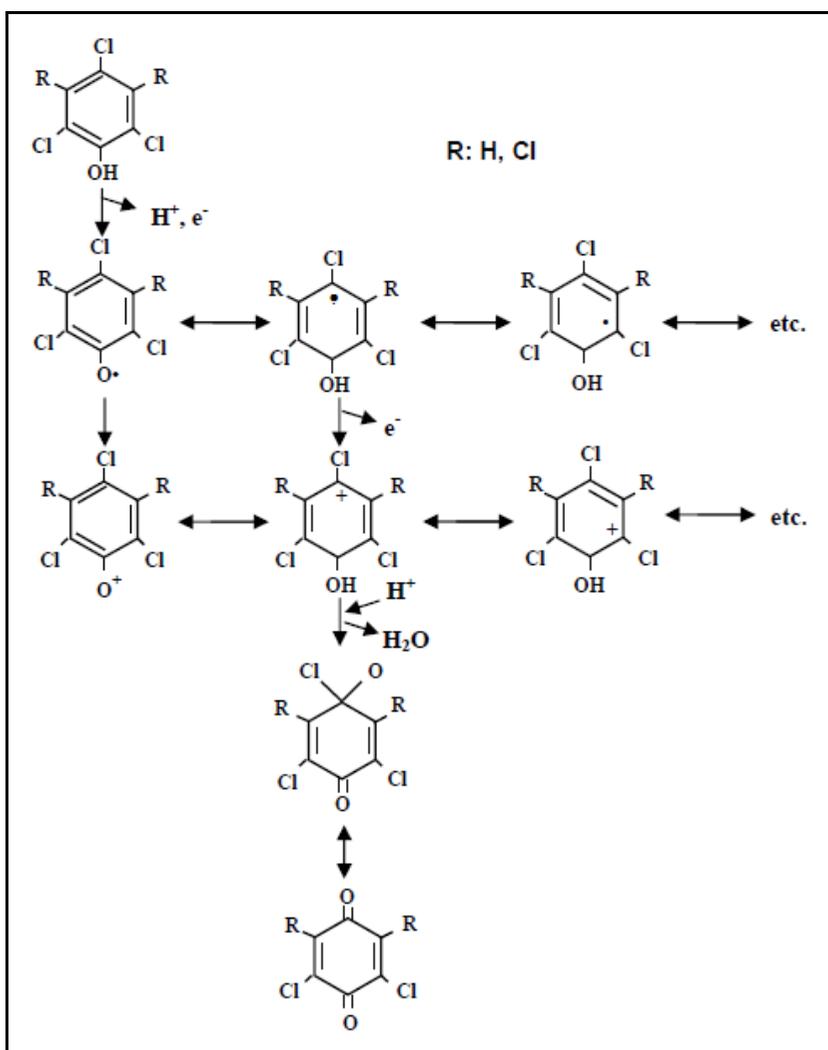
Estudios con diversos hongos de pudrición blanca han demostrado que MnP parece ser más común que la LiP (Rodakiewicz-Nowak, 2000, Shin *et al.*, 2005), y en estos últimos años se ha estudiado extensivamente las características y el rol de la enzima MnP (Grabski *et al.*, 1998; Podgomik y Podgomik, 2004;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

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

La mayoría de estas enzimas son importantes industrialmente y por lo tanto, los estudios de nuevos organismos capaces de producir estas enzimas son interesantes por su potencial uso en el proceso de biodegradación de compuestos recalcitrantes (Gianfreda y Rao, 2004; Levin *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004; Tortella *et al.*, 2005).

**3.3.4 Degradación de pentaclorofenol por hongos de pudrición blanca.** La transformación de clorofenoles por *basidiomicetos* produce una elevada mineralización (50-70%) (Valli y Gold, 1991; Leontievsky *et al.*, 2000; Reddy y Gold, 2000). En la Figura 6 se presenta el primer paso de la oxidación de clorofenoles con la formación de para-quinona y la consecuente liberación de un átomo de cloro. En este proceso participan las enzimas extracelulares lacasa y peroxidasas, y la decloración es causada por la inserción de uno o dos grupos OH en el anillo en la posición donde el átomo de cloro es liberado (Gianfreda y Bollag, 2002).

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



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

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

### 3.4 Crecimiento de los hongos de pudrición blanca en cultivo líquido

El crecimiento de los hongos de pudrición blanca en cultivos líquidos, genera un crecimiento en diversas formas, tales como, pellets o aglomeraciones esféricas de hifas, como micelio libre y disperso por todo el medio de cultivo y como pequeños agregados sueltos de micelio, presentes en una forma de crecimiento disperso (Žnidaršic y Pavko, 2001; Lin *et al.*, 2008).

El crecimiento de hongos en forma de pellets se convierte en la morfología más adecuada para procesos industriales, ya que esta forma no sólo reduce la viscosidad del medio, sino que también permite la posibilidad de la reutilización de la biomasa y por lo tanto la operación continua del proceso (Žnidaršic y Pavko, 2001; Lin *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que cuando los hongos son crecidos en forma de pellet aumenta la transferencia de oxígeno, lo cual reduce el consumo de energía por aireación y agitación (Borràs *et al.*, 2008). Sin embargo, los pellets son una forma de crecimiento que puede llevar a reducir la masa de células y la actividad ligninolítica como consecuencia de la limitación del sustrato en el centro del pellet al superar éste un radio crítico, generándose condiciones anaerobias y en consecuencia una lisis celular disminuyendo la eficiencia del proceso de remoción (Moreira *et al.*, 2003).

El tamaño de pellets adecuado permite una alta actividad ligninolítica de los hongos y degradación de contaminantes. Borràs *et al.*, (2008), demostraron que el pellet de *Trametes versicolor* de un tamaño aproximado de 3,0 mm presentó una mayor degradación de colorantes de aguas residuales. Asimismo, Feng *et al.*, (2003), determinaron que el tamaño más adecuado de los pellets del hongo *Metarhizium anisopliae* se encontró alrededor de 2,0 mm de diámetro.

Estas condiciones da lugar a la aplicación de prácticas y técnicas más minuciosas que permitan el cultivo de los hongos y por tanto el control y regulación de la extensión de las hifas y tamaño de los pellets, las cuales son condiciones importantes a tener en cuenta para optimizar su potencial funcionamiento y aplicación (Moreira *et al.*, 2003).

### 3.5 Inmovilización de hongos de pudrición blanca

Algunos de los factores más importantes a tener en cuenta para el uso de las tecnologías con hongos de pudrición blanca son: lograr una colonización abundante, mantener su crecimiento por un largo período de tiempo y favorecer la producción de enzimas ligninolíticas. Por esta razón, para lograr un óptimo crecimiento del micelio del hongo se utilizan soportes los que proporcionan rigidez, tamaño, porosidad y la resistencia frente a la competencia con otros microorganismos (Zhang y Yu, 2000; Fomina y Gadd, 2002; Meysami y Baheri, 2003; Moredo *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2004; Lechner y Papinutti, 2006; Ortega-Clemente *et al.*, 2007; Rubilar *et al.*, 2007 a, b; Vassilev *et al.*, 2009).

Diversos estudios han utilizado residuos orgánicos como soportes para hongos de pudrición blanca, dentro de los cuales se encuentra: astillas de madera, paja de trigo, aserrín, cáscaras de manzana, mazorcas de maíz, harina de maíz, semillas de uva, salvado de cebada, entre otros (Meysami y Baheri, 2003; Moredo *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2004; Lechner y Papinutti, 2006; Ortega-clemente *et al.*, 2007; Rubilar *et al.*, 2007 a, b). Asimismo, también se han utilizado soportes de tipo inorgánico, tales como, minerales de arcillas (zeolita, bentonita y kaolinita) (Fomina y Gadd, 2002; Küçük y Kivanç, 2005), roca fosfórica (Vassilev *et al.*, 2009) y carbón activado (Zhang y Yu, 2000; Ortega-clemente *et al.*, 2007).

Para la estructura del pellet inmovilizados en soportes Zhang y Yu (2000) y Fomida y Gadd (2002) han sugerido un modelo general, el cual consiste en tres capas principales: un núcleo central, con micelio densamente agregados con el soporte o matriz de soporte/polisacáridos, una capa intermedia con una mezcla del micelio suelto y soporte, y una zona exterior, o densa, con hifas sueltas rodeadas por el soporte.

Por lo general los estudios de inmovilización de pellets se han realizado con soportes en forma individual. Sin embargo, Ortega-clemente *et al.*, (2007), estudiaron el tratamiento de efluente de la industria de pulpa y papel mediante pellet de *Trametes versicolor* inmovilizado en una mezcla de carbón activado en polvo y aserrín, demostrándose mayor eficacia de eliminación de los parámetros contaminantes en comparación a pellets sin soportes.

Por lo tanto, el uso de soportes es beneficioso para el crecimiento y la estabilidad de los hongos durante un tratamiento de aguas contaminadas. Sin embargo, es necesario evaluar diversos aspectos que pueden influir en la eficiencia del proceso, tales como el efecto de la concentración de la mezcla de soporte sobre la forma y el tamaño del pellet y la eficiencia de degradación del contaminante.

### **3.6 Encapsulación de hongos de pudrición blanca en alginato de calcio**

Una técnica para lograr una mayor protección y estabilidad de los hongos es la encapsulación en un hidrogel. La encapsulación de células en un hidrogel permite una mayor estabilidad de las células durante operaciones continuas en diferentes procesos, permitiendo una mayor eficiencia de remoción en comparación a procesos con células libres.

Polímeros naturales como el alginato de calcio, alcohol polivinílico alginato de calcio (PVA), pectina, quitosano, carragenina y derivados de la celulosa han sido utilizados como matrices para la inmovilización (Lestan *et al.*, 1998; Wu y Yu, 2007), siendo el alginato de calcio el más utilizado.

El alginato de calcio es una de las sales del ácido algínico proveniente de algunas variedades de algas. Se suele emplear en la industria alimentaria como un espesante y emulsionante, así como en los laboratorios de biología para fijar cepas de bacterias en soportes.

El uso de alginato de calcio posee una serie de ventajas, debido a que es de origen natural, es biodegradable, de naturaleza hidrofílica, posee una baja densidad, estabilidad mecánica y estabilidad en un rango de pH entre 3.0 y 6.0 (Arica *et al.*, 2001).

Estudios realizados por Wu y Yu (2007) demostraron que el hongo *P. chrysosporium* encapsulado en alginato de calcio presentó una elevada resistencia mecánica y una eficiencia de degradación de 2,4- diclorofenol (> 60%), siendo muy superior a la obtenida con el hongo no encapsulado. En este mismo ámbito, Loomis *et al.*, (1997), estudiaron la encapsulación con alginato de calcio del hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* con el objetivo de degradar 2,4,6-trinitrotolueno y mantener su viabilidad durante su almacenamiento. Los resultados demostraron una alta degradación del contaminante y una viabilidad del 100% cuando los pellets son almacenados a temperatura ambiente.

Por lo tanto, el uso de polímeros para proteger a los hongos de pudrición blanca de factores ambientales es de vital importancia para procesos biotecnológicos de degradación de contaminantes orgánicos.

### **3.7 Técnicas de almacenamiento de hongos de pudrición blanca**

Se han realizado muchos estudios sobre la degradación de contaminantes por hongos de pudrición blanca inmovilizados en diferentes soportes. Sin embargo, estos estudios han sido desarrollados con inóculos que se forman y se usan inmediatamente en el proceso de degradación. El mantenimiento del potencial de inoculación durante el almacenamiento, transporte y aplicación son factores que han sido poco estudiados.

El uso de componentes naturales como soportes para la inmovilización de hongos, hace posible y satisfactoria la realización de un proceso de eliminación de la contaminación. Sin embargo, existen diversos factores que pueden controlar la calidad del inóculo en el tiempo, la utilización de la producción, almacenamiento y posterior utilización en el proceso de biorremediación. La influencia de estos factores ha sido estudiada principalmente por Lestan *et al.*, (1996) y Lestan *et al.*, (1998) considerándose los más importantes: la humedad, viabilidad, resistencia mecánica y resistencia a la competencia y proliferación de microorganismos nativos del medio ambiente.

Estos factores tienen una relación estrecha entre ellos. Por ejemplo, la humedad es muy importante para la producción de inóculos, ya que este parámetro es la condición fundamental para la viabilidad de los inóculos y resistencia mecánica. La viabilidad de los propágulos de hongos es esencial para proporcionar la alta densidad poblacional, importante para la supervivencia de los microorganismos inoculados en el medio ambiente (Cassidy *et al.*, 1996).

#### 4. HIPÓTESIS

La formulación de un pellet del hongo de pudrición blanca *Anthracoxyllum discolor* inmovilizado en una mezcla de soportes y encapsulado en alginato de calcio, demostrará una elevada degradación de PCF. Asimismo, la formulación del pellet permitirá su almacenamiento sin perder su actividad ligninolítica y por lo tanto, la capacidad de degradar pentaclorofenol.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Desarrollar un pellets del hongo de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor*, con características físicas y biológicas que permitan mantener su potencial de degradación durante condiciones de almacenamiento y su posterior uso en la degradación de PCF.

### 5.2 Objetivos específicos.

Evaluar el efecto sobre la inmovilización de las diferentes concentración de la mezcla de soportes de carbón activado y aserrín, aplicados en la elaboración de pellets de *A. discolor*.

Evaluar el efecto de la concentración de alginato de calcio sobre la morfología y el potencial ligninolítico del hongo *A. discolor*.

Evaluar la degradación de PCF por el pellet de *A. discolor* inmovilizado en la mezcla de soporte y encapsulado en alginato de calcio.

Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad del pellet de *A. discolor*.

Evaluar el efecto de la deshidratación del pellet como una forma de almacenamiento sobre la viabilidad del hongo y la degradación de PCF.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Compuestos químicos

Se utilizó pentaclorofenol (Sigma-Aldrich, 98% de pureza), el que se preparó a una disolución de 1000 mg/L en NaOH 0,5 N. Se colocó en un frasco ámbar protegido de la luz y se mantuvo a 4°C. A partir de la disolución concentrada se adicionó a los medios de cultivo según los requerimientos de concentración de PCF de cada experimento.

Se utilizó alginato de calcio (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3 y 4% p/v para la encapsulación del pellet de *A. discolor*. Además, se utilizó Azul de Remazol Brillante (Sigma-Aldrich) para la determinación de la viabilidad y potencial ligninolítico del hongo.

### 6.2 Microorganismo utilizado

Se utilizó el hongo de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor* perteneciente a la colección de cultivo del laboratorio de Biotecnología Ambiental de La Universidad de La Frontera (Chile).

### 6.3 Medios de cultivo

**6.3.1 Cultivo de conservación de la cepa.** La cepa *A. discolor* se conservó en tubos inclinados a 4°C con el medio descrito en el Cuadro 2, esterilizado en autoclave por 20 minutos a 121°C.

**Cuadro 2.** Medio de cultivo para la conservación de hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Agar	15g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0g
Glucosa	20g	MgSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,5g
Peptona	5,0g	pH	5,5
Extracto de levadura	2,0g		

**6.3.2 Cultivo de mantenimiento.** A partir de los tubos de conservación, se tomó una parte del micelio y se colocó en el centro de placas Petri con el medio descrito en el Cuadro 3. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 7 días. Luego, las placas fueron retiradas de la incubadora y se almacenaron en un refrigerador a 4°C por no más de 7 días antes de ser utilizadas para la preparación del inóculo.

**Cuadro 3.** Medio de mantenimiento agar extracto de malta, glucosa (G-AEM) para hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Agar	15 g	Extracto de malta	3,5 g
Glucosa	15 g	pH	5,5
Aserrín	10 g		

**6.3.3 Cultivo de crecimiento.** El inóculo fue preparado a partir del cultivo del hongo en placas, transfiriéndose 7 trozos circulares de agar colonizado (6 mm de diámetro) a un matraz Erlenmeyer de 1L conteniendo 100 mL de medio de cultivo descrito en el Cuadro 4. Los matraces se incubaron a 25°C durante 6-7 días en condiciones estáticas, hasta la formación de micelio. El cultivo fue posteriormente homogenizado en un blender durante 70 segundos antes de ser utilizado como inóculo.

**Cuadro 4.** Medio de crecimiento para hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Glucosa	15 g	Extracto de levadura	2,5 g
Peptona	5 g	pH	5,5

**6.3.4 Cultivo Kirk modificado.** En matraces Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 100 mL de medio Kirk modificado (Cuadro 5), utilizados para la posterior formación de pellets *A. discolor*.

**Cuadro 5.** Medio de cultivo Kirk modificado para hongos de pudrición blanca (Moreira *et al.*, 1997)

Composición del medio (Cantidad para 1L)			
Glucosa	10 g	CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
Peptona	2,0 g	Acetato de sodio	3,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g	Elementos trazas	10 mL
MgSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,5 g	Tween 80 (al 10%)	5,0 mL
pH	5,0		
Elementos traza (Cantidad para 1 L)			
MgSO <sub>4</sub>	3,0 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub>	0,5 g	CuSO <sub>4</sub>	0,1 g
NaCl	1,0 g	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,01 g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,01 g
CoCl <sub>2</sub>	0,1 g	AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12H <sub>2</sub> O	0,01 g

## 6.4 Ensayos

**6.4.1 Efecto de la concentración de soportes sobre la inmovilización de *A. discolor*.** Se transfirieron 2 mL de inóculo de *A. discolor* homogeneizado (descrito en el punto 6.3.3) en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio Kirk modificado (Cuadro 5). A cada matraz se añadió una mezcla (1:1) de carbón activado y aserrín en polvo, en las siguientes cantidades: 0,05; 0,1; 0,15; 0,3 y 0,5 g/L de cada tipo de soporte. Luego, los matraces fueron incubados durante 10 días en un agitador orbital a 100 rpm y 25°C. Adicionalmente, se incubaron matraces sólo con el inóculo para efectos comparativos.

Los pellets formados en los matraces fueron filtrados por una malla de 0,5 mm de diámetro de tamaño de poro. El soporte residual suspendido fue cuantificado por diferencia de peso a 105°C. La concentración de la mezcla de soporte que mostró una eficiencia de inmovilización mayor a 85% fue el seleccionado para estudios posteriores.

**6.4.2 Efecto de la concentración de alginato de calcio sobre la morfología y el potencial ligninolítico del hongo *A. discolor*.** Los pellets inmovilizados en la concentración de la mezcla de soportes seleccionados fueron depositados en 50 mL de una solución de alginato de calcio al 3 y 4 % p/v, según corresponda. La solución se mezcló durante 5 minutos a 25°C, enseguida la mezcla se retiró con una micropipeta de 1000 µL, depositándose alícuotas de la mezcla de alginato de calcio y pellet sobre la solución de CaCl<sub>2</sub> (0,1M), la cual se mantuvo siempre en agitación. Las esferas formadas fueron dejadas en la solución de CaCl<sub>2</sub> durante 2 horas en agitación. Posteriormente, la solución CaCl<sub>2</sub> (0,1M) con las esferas fueron mantenidas por un período aproximado de 4 horas a 4°C, después de lo cual la solución de CaCl<sub>2</sub> fue removida. El potencial ligninolítico de los pellets se evaluó mediante la decoloración de Azul de Remazol Brillante (ARB), dónde los pellets formados anteriormente (descritos en el punto 6.4.2) fueron inoculados en placas Petri. Para ello se prepararon placas con un medio compuesto por 15 g/L de

glucosa, 15 g/L de agar, 3,5 g/L de extracto de malta y 0,05% de ARB. Las placas fueron inoculadas en el centro con un tipo de cada pellets e incubadas durante 7 días a 25°C. Midiéndose diariamente el halo de decoloración. Además, se evaluó la morfología de los pellets encapsulados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

La concentración de alginato de calcio que mostró una mayor viabilidad del hongo y formación homogénea de los pellets fue seleccionada para estudios posteriores.

**6.4.3 Degradación de PCF por el pellet de *A. discolor* inmovilizado en la mezcla de soporte y encapsulado en alginato de calcio.** Los ensayos fueron realizados en matraces de 100 mL por triplicado. A cada matraz se adicionó 25 mL de medio Kirk modificado (Cuadro 5) y 10 de cada uno de los pellets formados en la actividad desarrollada en el punto 6.4.2. Además se utilizaron pellets inmovilizados en la mezcla de soporte sin encapsulación con alginato de calcio y pellets libre (sin soporte y sin alginato) para efectos comparativos.

Posteriormente, a cada matraz se adicionó PCF de modo de obtener una concentración inicial de 12 y 25 mg/L. Los matraces fueron incubados por 20 días en un agitador orbital en oscuridad a 100 rpm y 25°C. A los 0, 3, 5, 10, 15 y 20 días se extrajo 800 µL de muestra, de la cual se determinó la concentración residual de PCF por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

**6.4.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad del pellet *A. discolor*.** Los pellets formados anteriormente (descritos en el punto 6.4.2), fueron almacenados en viales color ámbar de 5 mL con agua destilada estéril a 4 y 20°C durante 80 días. A los 0, 15, 30, 60 y 80 días se extrajo pellets para evaluar la viabilidad del hongo mediante la decoloración de ARB (descrito en el punto 6.4.3). Además se utilizaron pellets inmovilizados en la mezcla de soporte sin encapsulación con alginato de calcio y pellets libre (sin soporte y sin alginato) para

efectos comparativos. Las diferencias presentadas en la viabilidad en cada tipo de pellet evaluado se analizaron por el estudio de comparación múltiple de Tukey, con un valor  $p < 0,05$ .

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó la temperatura que permita mantener una mayor viabilidad de los pellets durante el periodo de almacenamiento evaluado.

**6.4.5 Efecto de la deshidratación del pellet como una forma de almacenamiento sobre la viabilidad del hongo y la degradación de PCF.** Los pellets inmovilizados y encapsulados en alginato de calcio (seleccionados en la actividad 6.4.2) fueron secados a 30 °C durante 12 horas. Luego, los pellets deshidratados fueron almacenados a 4°C durante 80 días. A los 1, 15, 30, 50 y 80 días se evaluó la viabilidad del hongo mediante la decoloración de ARB. Además, a los mismos tiempos se evaluó la degradación de aproximadamente 15mg/L de PCF. Para ello se utilizaron matraces de 100mL, a los cuales se les adicionó 25 mL de medio Kirk modificado y 12 pellets. Los matraces fueron incubados en un agitador orbital a 100rpm y 25°C durante 24 horas para su hidratación. Luego, desde cada matraz se extrajo 2 pellets a los cuales se les determinó la viabilidad mediante la medición del potencial ligninolítico (descrito en el punto 6.4.3), en el cuál se determinó la velocidad de decoloración por la medición de los promedios de las pendientes entre el tiempo de incubación y el halo de decoloración.

Velocidad de decoloración:  $(T(x+1)) - (T(x)) / D(x+1) - D(x)$

Donde,  $T(x+1)$ : tiempo  $x+1$  de incubación de la placa con ARB inoculada con el pellet

$T(x)$ : tiempo  $x$  de incubación de la placa con ARB inoculada con el pellet

$D(x+1)$ : decoloración al tiempo  $x+1$  de la placa con ARB inoculada con el pellet

$D(x)$ : decoloración al tiempo  $x$  de la placa con ARB inoculada con el pellet

A los matraces con los 10 pellets restantes se les adicionó PCF de modo de obtener una concentración inicial de aproximadamente 15 mg/L. Luego, los matraces fueron incubados en un agitador orbital en oscuridad a 100 rpm y 25°C durante 25 días.

El efecto de la deshidratación sobre el pellet fue evaluado mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y la concentración de PCF fue determinada por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

## **6.5 Metodología analítica**

**6.5.1 Microscopía electrónica de barrido.** Se tomaron pellets de aproximadamente 2,0-3,0 mm de diámetro. Se colocaron en una placa Petri y se dejaron secar por 12 horas a 50°C.

La microscopía fue realizada en la biomasa del pellet para determinar el tamaño de la estructura y la superficie de los pellets de hongos (Fomina y Gadd, 2002). Los pellets se sumergieron en glutaraldehído (2% v/v) durante 15 minutos y se lavaron con buffer fosfato 0,1 M (pH 7,0). Posteriormente, las muestras se colocaron en tetraóxido de osmio por dos horas y fueron deshidratadas por medio de inmersiones de 15 minutos en etanol con agua destilada a diferentes concentraciones (50 – 100%). Las muestras fueron depositadas sobre el soporte de muestras y recubiertas con oro para hacer observaciones con el microscopio electrónico de barrido (SEM, Jeol 5200) equipado con un espectrómetro de energía dispersiva (EDS) detector (Oxford), perteneciente al laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad de Concepción. EDS espectros fueron adquiridos a partir de la superficie interior y exterior de los pellets para la detección de su composición elemental.

**6.5.2 Cuantificación de PCF por HPLC.** Para la determinación de la concentración de PCF, la muestra extraída de los medios de cultivos fue previamente filtrada por una membrana de tamaño de poro de 0,2 µm. La concentración de PCF se determinó por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) utilizando un equipo con bomba Merck-Hitachi modelo L-7100, acoplado a un inyector de Rheodyne, modelo 7725i con un loop de inyección de 20 µL. la columna

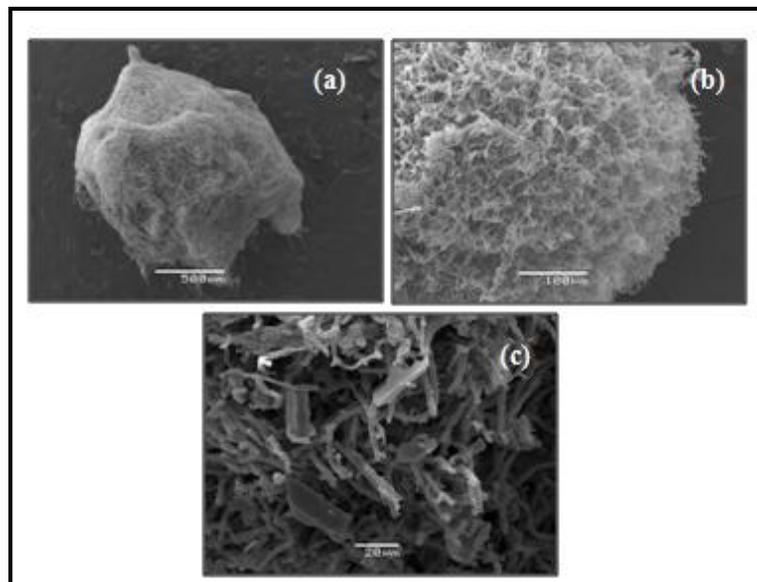
utilizada fue de fase reversa Lichrophere 60RP select B (5 $\mu$ m), 250 mm de longitud y 4mm de diámetro. El flujo del sistema fue mantenido en 1 mL/min y la detección se realizó con un detector de arreglo de diodo Merck-Hitachi modelo L-7455. La detección fue realizada a 215nm. La fase móvil consistió en una mezcla acetonitrilo-ácido fosfórico (1%) en mezcla 1:1.

## 7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Efecto de la concentración de soportes sobre la inmovilización de *A. discolor*.

Se añadieron diferentes cantidades de la mezcla de soporte compuesta por carbón activado y aserrín en polvo en el medio de cultivo de hongos para la evaluación de la formación de pellets. Todos los pellets mostraron un núcleo formado por la mezcla de soportes y rodeado por una capa de micelio fúngico.

En la Figura 7 se muestra el pellet *A. discolor* inmovilizado en la mezcla de soporte, observándose las hifas filamentosas irregularmente entrelazadas que forman el pellet (Figura 7 a, b). La sección transversal muestra la mezcla de soportes en el centro de la estructura del pellet y rodeado por las hifas (Figura 7 c).



**Figura 7.** Micrografía electrónica de barrido de pellets inmovilizados en una mezcla de soporte. a) Tamaño del Pellet (500µm) (b) Superficie exterior (100µm) y (c) Sección transversal (20µm)

Con la adición de diferentes concentraciones de la mezcla de soporte se observó diferencias en la eficiencia de la inmovilización de los pellets (Cuadro 6). En el rango de 0,05 y 0,5 g/L de ambos soportes, la eficiencia de inmovilización fue entre el 92 y 87%, disminuyendo significativamente con el aumento de la dosis de la mezcla de soporte. Por el contrario, el soporte residual aumentó cuando las concentraciones iniciales de los soportes fueron superiores a 0,15 g/L de carbón activado y aserrín.

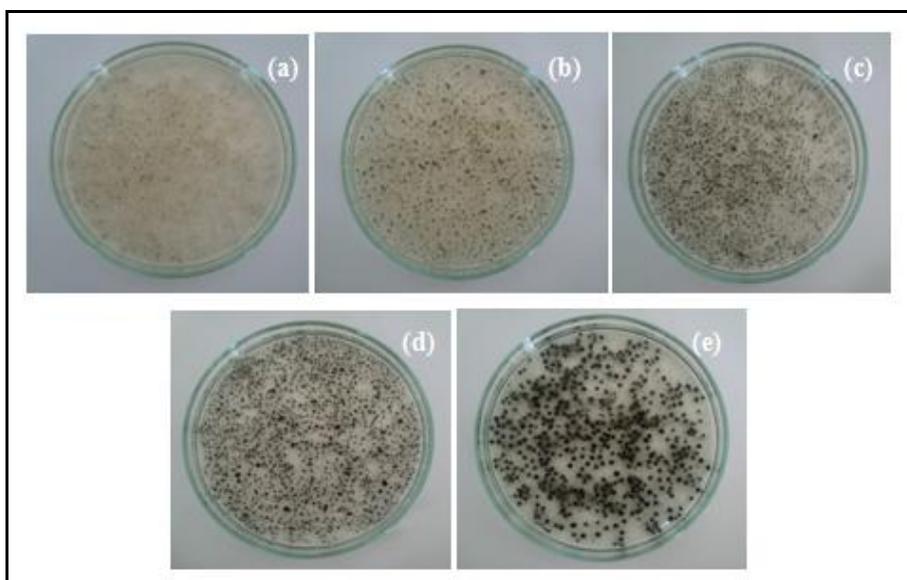
**Cuadro 6.** Concentración residual y atrapado de la mezcla de soporte (carbón activado y aserrín) en la formación de pellets de *A. discolor*

Concentración soporte inicial (g/L)		Soporte Residual	Soporte Atrapado
Carbón activado	Aserrín	(%)	(%)
0,05	0,05	8,5 ± 1,1	92,2 ± 2,1
0,1	0,1	11,9 ± 0,5	88,1 ± 3,2
0,15	0,15	13,4 ± 0,3	87,8 ± 1,3
0,3	0,3	37,7 ± 1,5	62,5 ± 3,2
0,5	0,5	52,9 ± 2,1	45,2 ± 6,8

Los valores son el promedio de tres repeticiones (n = 3).

Resultados similares fueron reportados por Zhang y Yu (2000) en la inmovilización de *Trametes versicolor* con carbón activado, demostrando que con las concentraciones de carbón activado por debajo de 1 g/L es posible obtener una alta eficiencia en la inmovilización.

La cantidad de pellets formados en los medios de cultivos con diferentes concentraciones de la mezcla de soporte fue muy similar (Cuadro 6). Sin embargo, el tamaño de los pellets se vio afectado por las concentraciones adicionadas de la mezcla de soporte (Figura 8). Los pellets formados con una concentración de soportes entre 0,05 y 0,3 g/L alcanzaron un diámetro de 2,0–5,0 mm, mientras que el tamaño de los pellets con 0,5 g/L de los soportes mostró un diámetro de 4,0-6,0 mm. Los pellets con una mayor concentración de soporte presentaron un denso centro sólido, mientras que los pellets con concentraciones menores (0,05 y 0,10 g/L) mostraron una baja presencia de la mezcla de soportes en el núcleo.



**Figura 8.** Pellets de *A. discolor* inmovilizado en diferentes concentraciones de una mezcla de soporte compuesto por carbón activado y aserrín. (a) 0,05 g/L, (b) 0,1 g/L, (c) 0,15 g/L, (d) 0,3 g/L y (e) 0,5g/L de cada uno de los soportes utilizados en la mezcla.

Estudios desarrollados por Fomina *et al.*, (2002) demostraron que el uso de soportes para la inmovilización de los hongos tiene una influencia no sólo en el tamaño sino también en la morfología de los pellets. En este mismo contexto, Zhang y Yu (2000) demostraron que la

cantidad de soporte como el carbón activado tiene un efecto considerable sobre la formación y el tamaño del pellet, lo que puede afectar en un proceso de degradación de contaminantes tóxico.

Estudios desarrollados por Borràs *et al.*, (2008) y Feng *et al.*, (2003) demostraron que pellets de hongos de pudrición blanca con un diámetro superior a 3,0 mm la capacidad de degradación disminuye. Este efecto se debe principalmente a que a un mayor diámetro del pellets se produce una limitación del sustrato en el centro del pellet, generándose una lisis celular (Moreira *et al.*, 2003).

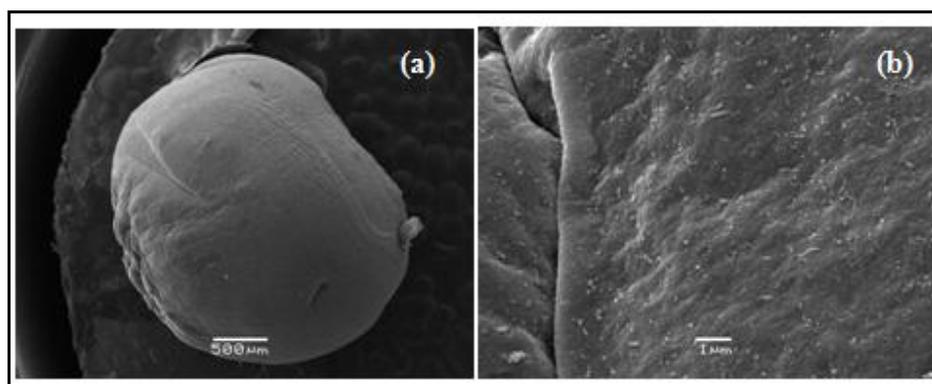
Por lo tanto, en relación con los resultados obtenidos es posible determinar que la concentración óptima de la mezcla de soporte para la formación de pellets es de 0,15 g/L, debido a que permite la formación de un pellet con estructura densa y una alta eficiencia de inmovilización.

## **7.2 Efecto de la concentración de alginato de calcio sobre la morfología y el potencial ligninolítico del hongo *A. discolor***

Para la encapsulación de los pellets de *A. discolor*, se evaluaron dos concentraciones de alginato de calcio (3 y 4% p/v), con el objetivo de determinar el efecto de la concentración del polímero sobre la morfología y el potencial ligninolítico del hongo.

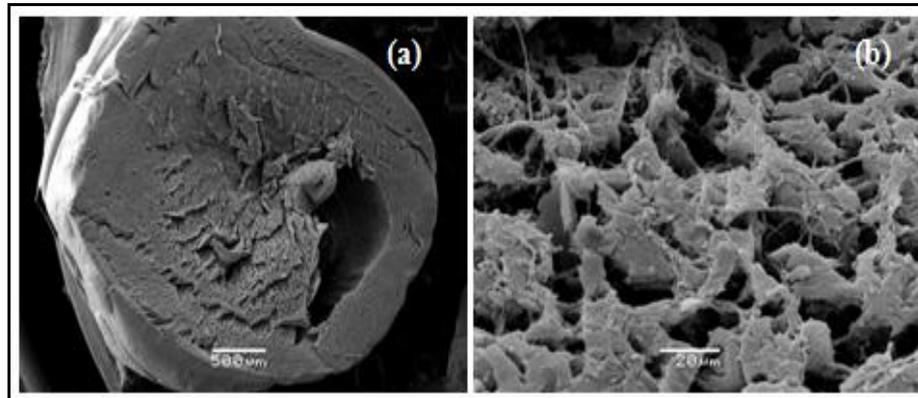
**7.2.1 Efecto en la morfología del hongo.** La morfología del hongo encapsulado con 3 y 4% p/v de alginato de calcio fue evaluado por MEB. La morfología de todos los pellets formados fue similar en ambas concentraciones de alginato de calcio, observándose una forma esférica de un tamaño entre 2,0-4,0 mm de diámetro.

La Figura 9 muestra a modo de ejemplo el pellets de *A. discolor* inmovilizado y encapsulado con alginato de calcio al 3% p/v. Por medio de esta micrografía se logró comprobar la efectiva encapsulación que realiza este polímero al atrapar por completo el pellet formado, donde no se observa micelio fúngico sobre la superficie de éste. Además de comprobar que presenta una morfología esférica, la cuál es determinante para su efectivo funcionamiento y posterior utilización.



**Figura 9.** Micrografía electrónica de barrido de pellets inmovilizados y encapsulados con alginato de calcio 3% p/v (a) Pellets individuales (500 μm) y (b) Superficie exterior (1 μm)

La Figura 10 muestra una sección transversal del pellet de *A. discolor* encapsulado con alginato de calcio al 3% p/v, observándose que el alginato de calcio rodea completamente el pellet de hongo inmovilizado en la mezcla de soporte y que por lo tanto protege al hongo.

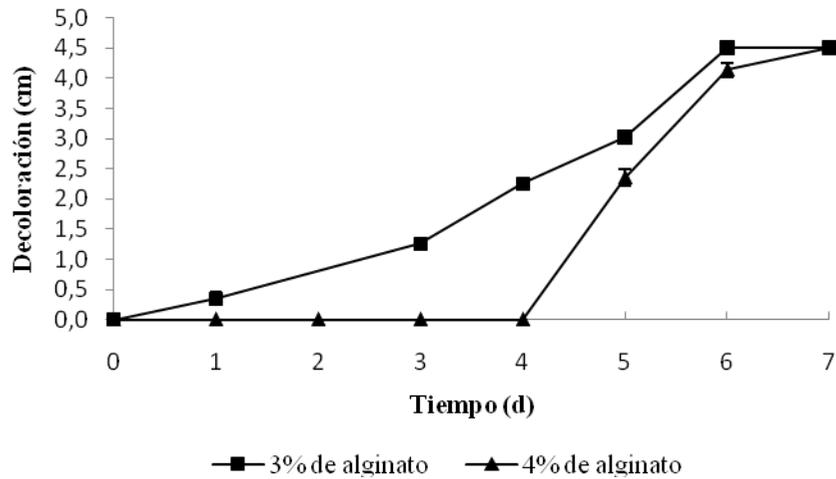


**Figura 10.** Micrografía electrónica de barrido de pellets inmovilizados y encapsulados con alginato 3% p/v (a) Sección transversal (500µm) y (b) parte interior del pellet (20µm)

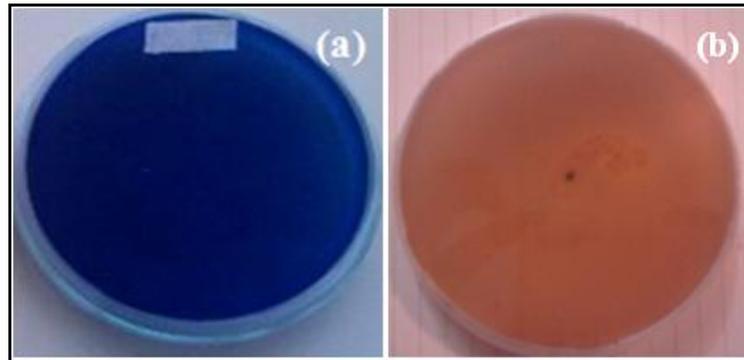
**7.2.2 Efecto en el potencial ligninolítico del hongo.** El potencial ligninolítico fue evaluado mediante la decoloración de ARB en placas con agar inoculadas con pellets encapsulados con ambas concentraciones de alginato de calcio (3 y 4% p/v).

La decoloración de algunos colorantes específicos, tales como Poly R-478 y ARB son utilizados como un método rápido y simple para determinar la capacidad ligninolítica de los hongos de pudrición blanca, siendo considerada una medición indirecta de actividad enzimática de hongos (Eichlerová *et al.*, 2007; Valentín *et al.*, 2007).

En la Figura 11 se muestra la decoloración de ARB por pellets de *A. discolor* inmovilizado en la mezcla de soportes y encapsulado en 3 y 4% p/v de alginato de calcio. Los resultados demostraron que la mayor decoloración fue obtenida con el pellet encapsulado con 3% p/v de alginato de calcio, decolorando completamente la placa a los 6 días de incubación (Figura 12), mientras que la decoloración de ARB por los pellets encapsulado con 4% p/v de alginato de calcio se completó a los 7 días de incubación.



**Figura 11.** Decoloración de ARB por pellet encapsulado en 3 y 4% p/v de alginato de calcio



**Figura 12.** Decoloración de ARB por pellet de *A. discolor* encapsulado con 3% p/v de alginato de calcio, (a) placa control sin inocular y (b) placa inoculada con el pellet

La principal diferencia observada en ambas concentraciones de alginato de calcio fue al inicio de la decoloración. Para el pellet recubierto con 3% p/v de alginato de calcio la decoloración comenzó a las 8 horas de incubación, mientras que para los pellets recubiertos con 4% p/v de alginato de calcio se inició a los 4 días de incubación (Figura 11).

La diferencia es posible atribuirlos a la porosidad del alginato de calcio. A mayor concentración de alginato de calcio hay una menor porosidad de la matriz, lo que significa una

mayor protección del hongo y una lenta difusión de la célula hacia el medio (Moayednia *et al.*, 2009). Este efecto se ve reflejado en el pellet encapsulado con 4% p/v de alginato de calcio, en el cual después de los 4 primeros días de incubación se observó crecimiento del hongo y decoloración de ARB.

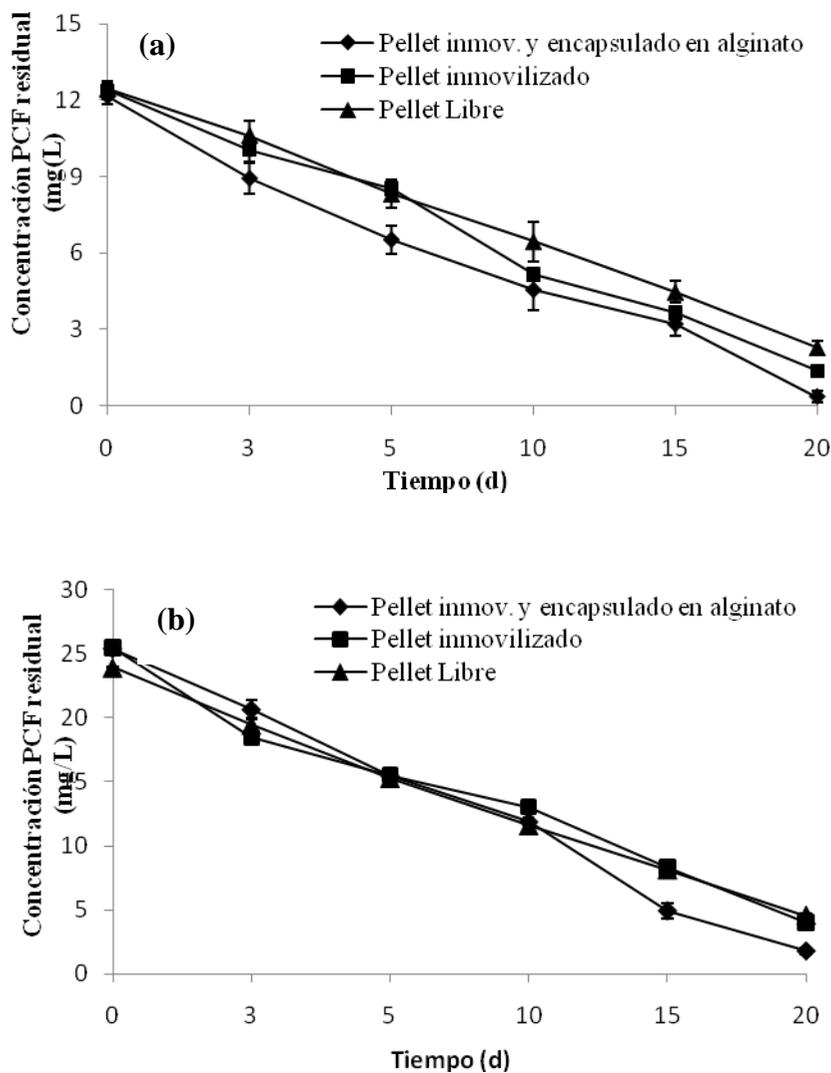
La continua actividad ligninolítica del hongo es un factor relevante en procesos de degradación de contaminantes, ya que puede determinar la eficiencia de remoción del sistema (Moreira *et al.*, 2000). Por lo tanto, en relación a los resultados obtenidos se seleccionó la concentración de 3% p/v de alginato de calcio para estudios posteriores.

### **7.3 Degradación de PCF por el pellet de *A. discolor* inmovilizado en la mezcla de soporte y encapsulado en alginato de calcio**

La degradación de 12 y 25 mg/L de PCF por el pellet inmovilizado en la mezcla de soportes y encapsulado con 3% p/v de alginato de calcio en comparación al pellet inmovilizado (sin alginato de calcio) y el pellet libre se muestra en la Figura 13.

La degradación de 12 mg/L de PCF por los pellets encapsulados con 3% p/v de alginato de calcio fue de 97%, correspondiente 11,8 mg/L de PCF, mientras la degradación de PCF por los pellets inmovilizados y los pellets libres fue de 89% (correspondiente a 11 mg/L) y 81,5% (correspondiente a 10,1 mg/L), respectivamente (Figura 13a). En cuanto a la degradación de 25 mg/L de PCF fue de 93%, 84%, 81% para los pellets encapsulado en alginato, los pellets inmovilizados y los pellets libres, respectivamente (Figura 13b).

Resultados similares fueron obtenidos por Tortella *et al.*, (2008) al evaluar la degradación de 25 mg/l de PCF por micelio libre de *A. discolor*, reportando una degradación de 86%.



**Figura 13.** Degradación de PCF por pellets de *A. discolor* inmovilizado en una mezcla de soportes (aserrín y carbón activado) y encapsulado en alginato de calcio al 3% p/v. (a) 12 mg/L de PCF y (b) 25 mg/L de PCF

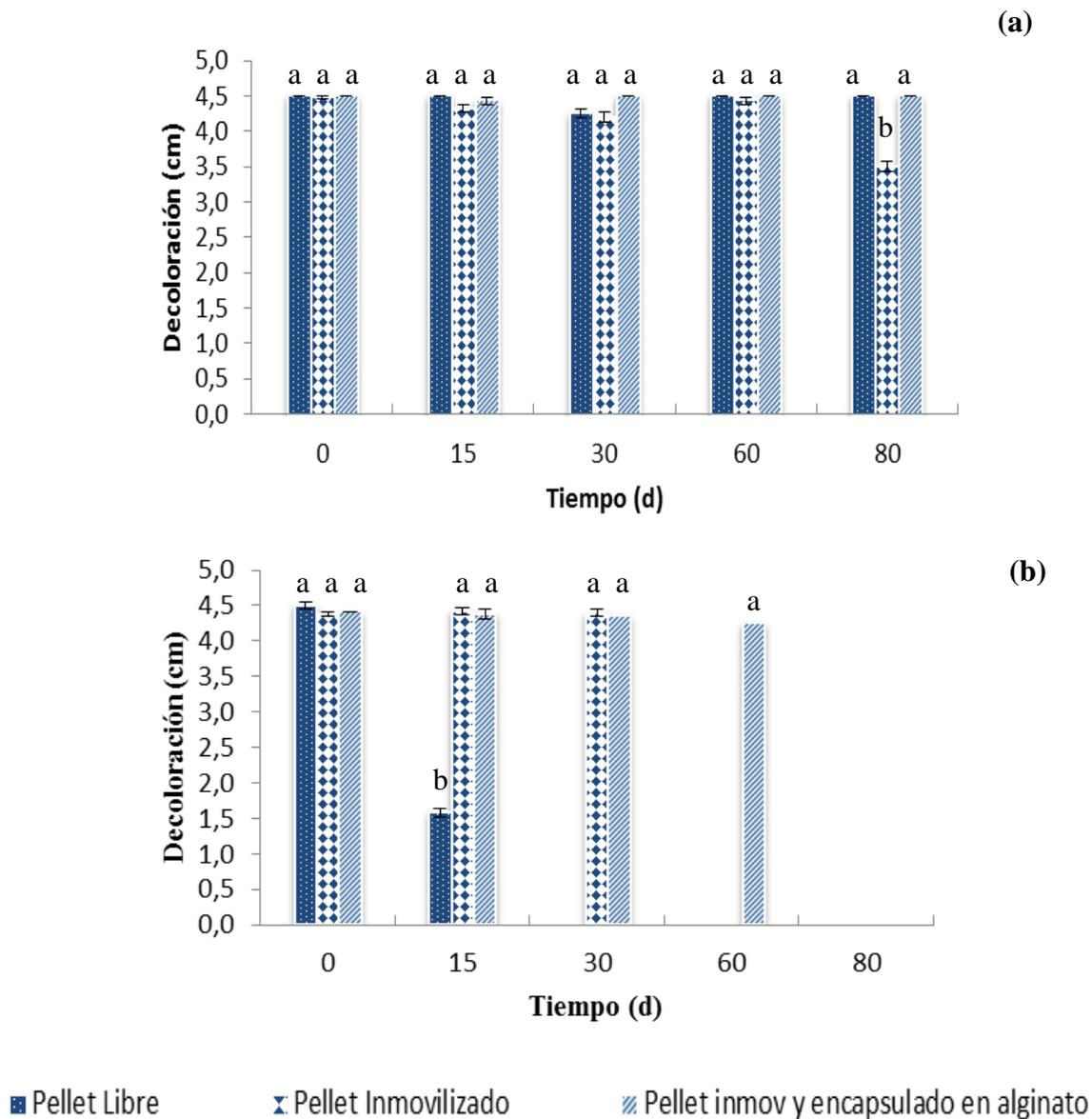
No se observó diferencias de degradación de PCF entre todos los pellets evaluados, lo que demuestra que el alginato no generó un impacto negativo en la actividad ligninolítica del hongo. Por lo tanto, la encapsulación del hongo en alginato de calcio es susceptible de ser utilizado como un método de almacenamiento del hongo.

#### **7.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad del pellet *A. discolor***

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la viabilidad del hongo almacenado en agua destilada estéril durante 80 días a 4 y 20°C (Figura 14). La viabilidad del hongo fue medida mediante la decoloración de ARB. Para efectos comparativos se evaluó la viabilidad de los pellets inmovilizados (sin alginato) y los pellets libre (sin soporte y sin alginato).

Los resultados demostraron que la temperatura de almacenamiento de 4°C no afectó la viabilidad de los pellets con excepción del pellet inmovilizado, siendo esta reducida a 78% a los 80 días de almacenamiento (Figura 14a). Asimismo, se observó que la temperatura de almacenamiento de 20°C afectó la viabilidad de todos los pellets evaluados con excepción del pellets inmovilizado y encapsulado (Figura 14b). El pellet libre presentó una viabilidad del 100% hasta los 30 días de almacenamiento, disminuyendo drásticamente hasta 0% en las mediciones posteriores. De igual forma se observó que los pellets inmovilizados mostraron una viabilidad de 100% el día 1 y 33% el día 15, no mostrando viabilidad en los siguientes periodos evaluados. Finalmente, el pellet inmovilizado y encapsulado presentó una viabilidad del 100% hasta los 60 días de almacenamiento.

Similares resultados fueron obtenidos por Loomis *et al.*, (1997) con la encapsulación de *P. chrysosporium*, demostrando que la viabilidad de los hongos almacenados a temperaturas menores a 5°C es mayor que a temperaturas superiores a 20°C. Esto debido a que a temperaturas cercanas a temperatura ambiente los hongos se mantienen activos consumiendo rápidamente los nutrientes y en ausencia de éstos pierden su viabilidad y por lo tanto su capacidad ligninolítica.



**Figura 14.** Viabilidad de los pellets libre, pellets inmovilizados y pellets inmovilizados y encapsulados en alginato de calcio al 3% p/v durante 80 días de almacenamiento a (a) 4°C y (b) 20°C

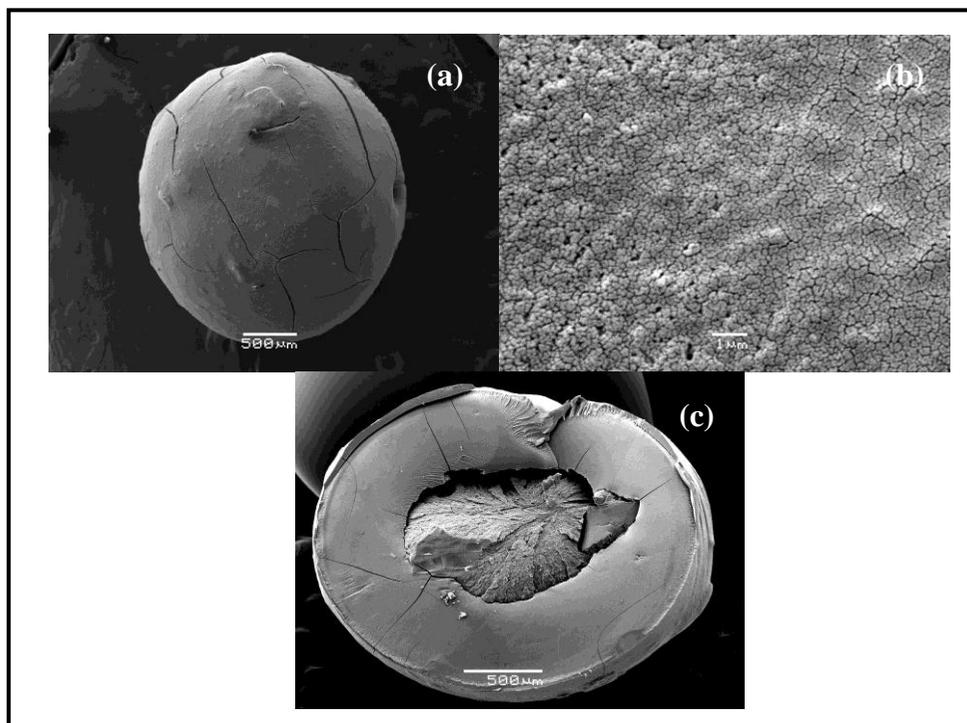
De acuerdo a los resultados obtenidos y mostrados en la figura 14, el factor temperatura juega un papel importante para lograr un adecuado almacenamiento de los pellets, lo que permite mantener la viabilidad del hongo, ya que el buen almacenamiento de éste, a condiciones controladas, principalmente de temperatura, ayudaría a la productividad y estabilidad de los

pellets de *A. discolor*. Además, esto demuestra que los hongos mantienen su capacidad de degradación, permitiendo así su utilización en procesos de degradación de contaminantes orgánicos de aguas residuales.

### **7.5 Efecto de la deshidratación del pellet como una forma de almacenamiento sobre la viabilidad del hongo y la degradación de PCF**

El alginato de calcio es el polímero más usado para almacenar los hongos de pudrición blanca (Loomis *et al.*, 1997; Arica *et al.*, 2001; Zhanga *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones almacenan los pellets en medio líquido o en agua destilada estéril, lo cual puede limitar el transporte y el manejo de estos hongos, así como también existe un alto riesgo de contaminación microbológica, disminuyendo la capacidad ligninolítica del hongo y por tanto la degradación del contaminante. Por esta razón se procedió a deshidratar los pellets inmovilizados en la mezcla de soportes y encapsulado en alginato de calcio. Paralelamente, también se realizó la deshidratación del pellet inmovilizado (sin alginato) y el pellet libre obteniendo como resultado la desintegración del pellet debido a que en este caso sólo se obtuvo biomasa en muy bajas concentraciones (< 1 mg).

La Figura 15 muestra la micrografía electrónica de barrido del pellet deshidratado. El pellet deshidratado mostró una forma esférica de aproximadamente 4,0 mm de diámetro (Figura 15a). En cuanto a la superficie externa del pellet se observaron pequeñas grietas debido al colapso parcial del polímero durante la deshidratación (Figura 15b). Además, se muestra una sección transversal del pellet, donde se observa el pellet inmovilizado completamente recubierto por alginato de calcio (Figura 15c).



**Figura 15.** Micrografía electrónica de barrido de pellets deshidratado. (a) pellet (500μm) (b) superficie externa del pellet (1 μm) y (c) sección transversal del pellet (500μm)

Se evaluó la viabilidad del pellet deshidratado almacenados durante 80 días a 4°C mediante la decoloración de ARB (Cuadro 7). Durante 30 días de almacenamiento no fue afectada la viabilidad de los pellets manteniéndose la velocidad de decoloración en 1,01 cm/día, Sin embargo, después de 50 días de almacenamiento la velocidad de decoloración disminuyó a 0,80 cm/día, llegando a una velocidad de decoloración de 0,69 cm/día a los 80 días de almacenamiento.

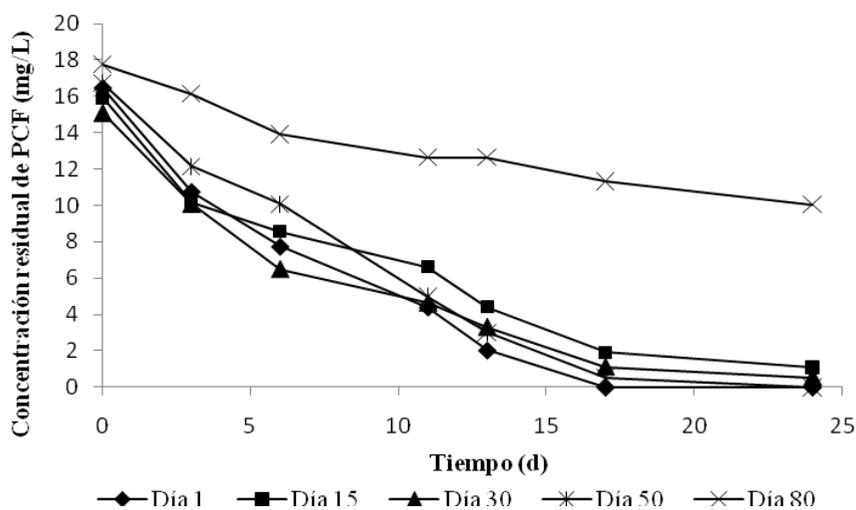
**Cuadro 7.** Decoloración de ARB por pellets de *A. discolor* deshidratado almacenados a 4°C durante 80 días.

<b>Tiempo de almacenamiento (d)</b>	<b>Velocidad de decoloración (cm/día ± DS)</b>
1	1,02 ± 0,01
15	1,01 ± 0,07
30	1,03 ± 0,05
50	0,80 ± 0,01
80	0,69 ± 0,02

Si bien al final del período de 80 días de almacenamiento se observó la presencia que los pellets presentaban viabilidad, la diferencia que existe entre los períodos de almacenamiento es la velocidad de decoloración, la cual disminuye con el paso del tiempo.

Asimismo, se evaluó la degradación de 15 mg/L de PCF por los pellets deshidratados y almacenados durante 80 días (Figura 16). Durante 50 días de almacenamiento la degradación fue superior a 93%, mientras que a los 80 días la degradación fue de 43,3%. Estos resultados demuestran que la viabilidad del hongo es afectada por el tiempo de almacenamiento, siendo reducida su capacidad para degradar PCF. En este sentido se podría concluir que hasta 50 días el alginato de calcio protege al hongo manteniendo su capacidad degradativa.

En este contexto, el uso de hidrogeles ha sido utilizado principalmente para proporcionar humedad y un mecanismo de lenta liberación del inóculo (Lestan *et al.*, 1996; Lestan y Lamar, 1999). La naturaleza hidrofílica de los hidrogeles facilita el crecimiento de microorganismos en ambientes donde la humedad relativa o el contenido de humedad se reduce (Lestan y Lamar, 1996).



**Figura 16.** Degradación de PCF con una concentración inicial de 15mg/L por pellets deshidratados y almacenados a 4°C durante 80 días

Muy poca información existe en relación al efecto de la deshidratación sobre la viabilidad de hongos de pudrición blanca, por lo que la formulación de un inóculo deshidratado puede ser un aporte muy relevante en la aplicación de procesos biotecnológicos con hongos de pudrición blanca.

## 8. CONCLUSIONES

La concentración de la mezcla de soportes compuesta por carbón activado y aserrín afectó la morfología y el tamaño del pellet del hongo de pudrición blanca *A. discolor*, siendo la concentración de 0,15 g/L de carbón activado y 0,15 g/L de aserrín la que presentó una mayor eficiencia de inmovilización.

La concentración de alginato de calcio afecta la difusión de las células hacia el medio, siendo más lenta la actividad ligninolítica del pellet encapsulado con 4% p/v de alginato de calcio que la demostrada por el pellet encapsulado con 3% p/v de alginato de calcio.

La encapsulación con 3% p/v de alginato de calcio del pellet de *A. discolor* inmovilizado en la mezcla de soporte no afectó la degradación de PCF, por lo cual la formulación del pellets es susceptible de ser utilizado como un método de almacenamiento del hongo de pudrición blanca *A. discolor*.

La temperatura de almacenamiento afecta la viabilidad de los hongos, siendo la temperatura de 4°C la que permite mantener la capacidad ligninolítica de los hongos por un periodo más prolongado.

La deshidratación de pellets de hongos de pudrición blanca inmovilizados en una mezcla de soportes y encapsulados con 3% p/v de alginato de calcio mantiene su viabilidad y potencial de degradación durante 50 días de almacenamiento, formulación que podría ser relevante en la implementación de un proceso biotecnológico de degradación de contaminantes.

## 9. LITERATURA CITADA

- Acevedo F, L Pizzul, M d P Castillo, R Cuevas, and M C Diez.** 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* 185:212-219.
- Alleman B, E Logan, and R Gilbertson.** 1992. Toxicity of pentachlorophenol to 6 species of white rot fungi as a function of chemical dose. *Applied and Environmental Microbiology* 58:4048-4050.
- Altwickler E.** 1991. Some laboratory experimental-designs for obtaining dynamic property data on dioxins. *Science of the Total Environment* 104:47-72.
- Arica M Y, Y Kaçar, and O Genç.** 2001. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. *Bioresource Technology* 80:121-129.
- Arisoy M.** 1998. Biodegradation of chlorinated organic compounds by white-rot fungi. *B. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60:872-876.
- ATSDR.** 2011. Toxicological profile for pentachlorophenol. Agency for toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Georgia.USA.
- Bending G D, M Friloux, and A L Walker.** 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship whit ligninolytic potencial. *FEMS Microbiology* 212:59-63.
- Borrás E, P Blánquez, M Sarrá, G Caminal, and T Vicent.** 2008. *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal* 42:61-66.
- Boul M, R Chong, and C Ford.** 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 71:361-369.
- Cassidy M B, H Lee, and J T Trevors.** 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16:79-101.
- Cea M, J C Seaman, A A Jara, M L Mora, and M C Diez.** 2005. Describing chlorophenol sorption on variable-charge soil using the triple-layer model. *Journal of Colloid and Interface Science* 292:171-178.

- Crestini C, A D'Annibale, G G Sermanni, and R Saladino.** 2000. The reactivity of phenolic and non-phenolic residual kraft lignin model compounds with Mn(II)-peroxidase from *Lentinula edodes*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8:433-438.
- Cullen D, and P J Kersten.** 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In R Brambl and G A Marzluf, editors. *The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology* Springer-Verlag. Berlin, Alemania pp 295-312.
- Dec J, and J M Bollag.** 1994. Dehalogenation of chlorinated phenols during binding to humus. In T A Anderson and J R Coats editors. *Bioremediation Through Rhizosphere Technology* American Chemical Society 563:102-111.
- Dec J, and J M Bollag.** 1990. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19:543-550.
- deJong E, and J A Field.** 1997. Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogenes by *basidiomycetes*. *Annual Review of Microbiology* 51:375-414.
- Eaton, R., and M. Hale.** 1993. Wood, decay, pests and prevention. Chapman and Hall, London. pp 546.
- Eichlerová I, L Homolka, and F Nerud.** 2007. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Dyes and Pigments* 75:38-44.
- Eichlerová I, L Homolka, F Nerud, F Zadrzil, and P Baldrian.** 2000. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates *Biodegradation* 11:279-287.
- Feng K, T Rou, B Liu, Y Tzeng, and Y Chang.** 2003. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34:22-25.
- Fomina M, and G M Gadd.** 2002. Influence of clays minerals on the morphology of fungal pellets. *Mycological Research Journal articles* 106:107-117.
- Gianfreda L, F Sannino, M T Filazzola, and A Leonowicz.** 1998. Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 4:13-23.
- Gianfreda L, F Xu, and J M Bollag.** 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3:1-25.

- Gianfreda L, and J M Bollag.** 2002. Isolated enzyme for the transformation and detoxification of organic pollutants. Marcel Dekker edition, New York pp 495-538.
- Gianfreda L, and M Rao.** 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35:339–354.
- Gold M H, and M Alic.** 1993. Molecular-biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57:605-622.
- Grabski A C, H J Grimek, and R R Burgess.** 1998. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn-III-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. *Biotechnology and Bioengineering* 60:204-215.
- Hammel K E.** 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New Journal of Chemistry* 20:195-198.
- Heinzkill M, L Bech, T Halkier, P Schneider, and T Anke.** 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 64:1601-1606.
- Hofrichter M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30:454-466.
- Janik F, and H U Wolf.** 1992. The  $Ca^{2+}$  - transport ATPase of human erythrocytes as an invitro toxicity test system – acute effects of some chlorinated compounds. *Journal of Applied Toxicology* 12:351-358.
- Kirk T K, and R L Farrel.** 1987. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignine. *Annual Review and Microbiology* 41:465-505.
- Küçük Ç, and M Kivanç.** 2005. Effect of formulation on the viability of biocontrol agent. *Trichoderma harzianum* conidia. *African Journal of Biotechnology* 4:483-486.
- Lechner B E, and V L Papinutti.** 2006. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochemistry* 41:594-598.
- Leonowicz A, N S Cho, J Luterek, A Wilkolazka, M Wojtas-Wasilewska, A Matuszewska, M Hofrichter, D Wesenberg, and J Rogalski.** 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 41:185-227.
- Leontievsky A A, N M Myasoedova, B P Baskunov, C S Evans, and L A Golovleva.** 2000. Transformation of 2, 4, 6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* 11:331-340.

- Lestan D, M Lestan, J A Chapelle, and R T Lamar.** 1996. Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Journal of Industrial Microbiology* 16:286-294.
- Lestan D, and R T Lamar.** 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2045-2052.
- Lestan D, M Lestan, and R T Lamar.** 1998. Growth and viability of micelial fragments of white-rot fungi on some hydrogels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24:244-250.
- Lestan D, and R T Lamar.** 1999. Influence of humidity on production of pelleted fungal inoculums. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:349-357.
- Levin L, L Papinutti, and F Forchiassin.** 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94:169-176.
- Leyva J, M C Ortiz, L H Diaz, and J A Morales.** 2009. "Switching regulator using a quadratic boost converter for wide DC conversion ratios". *IET Power Electronics* 2:605-613.
- Lin Y, W Liao, and S Chen.** 2008. Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. *Biotechnology and Bioengineering* 99:117-128.
- Litchfield C D, and M Rao.** 1998. Pentachlorophenol biodegradation: laboratory and field studies. In G A Lewandowski, and J DeFilippi, editors. *Biological Treatment of Hazardous Wastes*. Wiley, New York pp 271–293.
- Loomis A K, A M Childress, D Daigle, and J W Bennet.** 1997. Alginate encapsulation of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Current Microbiology* 34:127-130.
- McAllister K, A H Lee, and J T Trevors.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7:1-40.
- Meysami P, and H Baheri.** 2003. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. *Advances in Environmental Research* 7:881-887.
- Mileski G J, J A Bumpus, M A Jurek, and S D Aust.** 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Sciences and Environmental Microbiology* 54:2885-2889.

- Moayednia N, M R Ehsani, Z Emamdjomeh, M M Asadi, M Mizani, and A Mazaheri.** 2009. The effect of sodium alginate concentrations on viability of immobilized *Lactobacillus Acidophilus* in fruit alginate coating during refrigerator storage. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3:3213-3226.
- Moredo N, M Lorenzo, A Dominguez, D Moldes, C Cameselle, and A Sanroman.** 2003. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19:665-669.
- Moreira M T, G Feijoo, and J M Lema.** 2003. Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 2:247-259.
- Moreira M T, G Feijoo, R Sierra, J M Lema, and J A Field.** 1997. Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. Journal of Biotechnology 53:237-251.
- Moreira M T, I Mielgo, G Feijoo, and J M Lema.** 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. Biotechnology Letters 22:1499-1503.
- Ortega-Clemente A, M T Ponce, M C Montes, M T Vicent, J Barrera, and H M Poggi.** 2007. Semi-continuous treatment of recalcitrant anaerobic effluent from pulp and paper industry using hybrid pellets of *Trametes versicolor*. Water Science and Technology 55:125-133.
- Papinutti V L, L A Diorio, and F Forchiassin.** 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30:157-160.
- Paszczynski A, M B Pastigrigsby, S Goszczynski, R L Crawford, and D L Crawford.** 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Applied and Environmental Microbiology 58:3598-3604.
- Podgornik H, and A Podgornik.** 2004. Separation of manganese peroxidase isoenzymes on strong anion-exchange monolithic column using pH-salt gradient. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 799:343-347.
- Pointing S B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 57:20-33.
- Rappe C, H Buser, and H Bosshardt.** 1979. Dioxins, dibenzofurans and other polyhalogenated aromatics: production, use, formation, and destruction. Annals of the New York Academy of Sciences 320:1-18.

- Reddy G V B, and M H Gold.** 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium* intermediates and reactions involved. Society for General Microbiology Journals 146:405-413.
- Robinson T, G McMullan, R Marchant, and P Nigam.** 2001. Remediation of dyes in textiles effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology 77:247-255.
- Rodakiewicz-Nowak J.** 2000. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. Topics in Catalysis 11:419-434.
- Rubilar O, G Feijoo, M C Diez, T A Lu-Chau, M T Moreira, and J M Lema.** 2007a. Biodegradation of pentachlorophenol in soil slurry cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracophyllum discolor*. Industrial and Engineering Chemistry Research 46:6744-6751.
- Rubilar O, M C Diez, and L Gianfreda.** 2008. Transformation of chlorinated phenolic compounds by White rot fungi. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 38:227-268.
- Rubilar O, M Cea, G Tortella, T Miguens, C Trasar-Cepeda, and M C Diez.** 2007b. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in spanish and chilean soils by solid substrate cultures of *Anthracophyllum discolor*. Third International Conference, Enzymes in the Environment. 15-19 de Julio de 2007, Viterbo, Italia.
- Ruiz F J, M Morales, M Perez, T Choinowki, M J Martínez, K Pointek, and A T Martínez.** 2007. Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: A site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study. Biochemistry 46:66-77.
- Sato A, T Watanabe, Y Watanabe, K Harazono, and T Fukatsu.** 2002. Screening for *basidiomycetous* fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. Fems Microbiology Letters 213:213-217.
- Scott C D.** 1987. Immobilized cells: A review of recent literature. Enzyme and Microbial Technology 9:66-71.
- Shin K S, Y H Kim, and J S Lim.** 2005. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. Journal of Microbiology 43:503-509.
- Shiu W Y, K C Ma, D Varhanickova, and D Mackay.** 1994. Chlorophenols and alkylphenols. A review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment. Chemosphere 29:1155-1224.

- Tien M, and T K Kirk.** 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology 161:238-349.
- Tortella G, M C Diez, and N Duran.** 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. Critical Reviews in Microbiology 31:197-212.
- Tortella G, O Rubilar, L Gianfreda, E Valenzuela, and M C Diez.** 2008. Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:2805-2818.
- Tuomela M, M Lytikainen, P Oivanen, and A Hatakka.** 1999. Mineralization and concersion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Soil Biology and Biochemistry 31:65-74.
- Tuor U, H Wariishi, H E Schoemaker, and M H Gold.** 1992. Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidasa from *Phanerochaete chrysosporium* – oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model-compound. Biochemistry 31:4986-4995.
- USEPA.** 1979. Environmental Protection Agency. Suspended, cancelled, and restricted pesticides. Washington D. C. Office of Pesticides and Toxic Substances.
- Valentín L, T A Lu-Chau, C Lopez, G Feijoo, M T Moreira, and J M. Lema.** 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera sp.* BOS55. Process Biochemistry 42:641-648.
- Valli K, and M H Gold.** 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology 173:345-352.
- Vassilev N, A Requena, L Nieto, I Nikolaeva, and M Vassilei.** 2009. Production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* grown on medium containing agro-wastes/rock phosphate and biocontrol properties of the final product. Industrial Crop and Products 30:28-32.
- Walter M, L Boul, R Chong, and C Ford.** 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. Journal of Environmental Management 71:361-369.
- Wang J L, G Zhao, and L B Wu.** 2005. Slurry-phase biological treatment of nitrophenol using bioaugmentation technique. Biomedical and Environmental. Sciences 18:77-81.

- Wu J, and H Yu.** 2007. Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresource Technology* 98:253-259.
- Zhang F, and J Yu.** 2000. Decolourisation of acid violet 7 with complex pellets of white rot fungus and activated carbon. *Bioprocess Engineering* 23:295-301.
- Zhanga K, Y Xub, X Huaa, H Hana, J Wanga, Y Liub, and Z Liua.** 2008. An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal* 41:251-257.
- Žnidaršic P, and A Pavko.** 2001. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology* 39:237–252.

## 10. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de degradación 25mg/L de PCF por (a) Pellet libre (b) Pellet sin alginato y (c) Pellet con alginato 3% p/v.

(a)

Tiempo (d)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	Promedio	Desvest
0	23,856	25,386	24,065	23,961	0,074
3	20,154	17,945	18,765	19,460	0,491
5	15,788	14,436	14,798	15,293	0,350
10	12,483	11,945	10,675	11,579	0,639
15	8,432	7,934	7,778	8,105	0,231
20	4,743	4,892	4,325	4,534	0,148

(b)

Tiempo (d)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	Promedio	Desvest
0	25,833	25,463	25,213	25,503	0,205
3	18,634	18,475	18,283	18,464	0,128
5	15,786	15,485	15,287	15,519	0,164
10	12,845	13,273	13,028	13,049	0,015
15	7,283	8,928	8,732	8,314	0,295
20	4,282	3,683	4,028	3,998	0,021

(c)

Tiempo (d)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	Promedio	Desvest
0	25,574	25,845	24,894	25,438	0,384
3	21,386	21,023	19,564	20,658	0,773
5	15,374	15,783	15,264	15,474	0,148
10	11,656	11,023	12,934	11,871	0,752
15	4,354	4,654	5,745	4,918	0,585
20	1,433	1,753	2,122	1,769	0,249

Anexo 2. Tabla de degradación 12 mg/L de PCF por (a) Pellet libre (b) Pellet sin alginato y (c) Pellet con alginato 3% p/v.

(a)

Tiempo (d)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	Promedio	Desvest
0	12,286	13,034	11,985	12,435	0,318
3	10,384	11,673	9,765	10,607	0,596
5	8,045	9,345	7,537	8,309	0,546
10	6,847	7,154	5,354	6,452	0,776
15	4,895	4,673	3,849	4,472	0,441
20	2,354	2,573	1,984	2,304	0,226

(b)

Tiempo (d)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	Promedio	Desvest
0	12,573	12,634	11,937	12,381	0,314
3	10,745	10,028	9,363	10,045	0,482
5	8,794	8,384	8,394	8,524	0,092
10	5,334	5,291	4,838	5,154	0,224
15	3,782	3,892	3,283	3,652	0,261
20	1,182	1,576	1,349	1,369	0,014

(c)

Tiempo (d)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	PCF (mg/L)	Promedio	Desvest
0	12,423	12,128	11,934	12,162	0,161
3	9,782	8,673	8,349	8,935	0,414
5	6,935	6,384	6,253	6,524	0,192
10	4,983	4,382	4,283	4,549	0,188
15	2,893	3,683	3,045	3,207	0,115
20	0,121	0,715	0,243	0,360	0,082