

Degradación de toxafeno en medio líquido por *Bjerkandera* sp BOL13 utilizando diferentes sustratos

Martha Lacayo^{1,3}, Enrique Terrazas^{1,4}, Bert van Bavel² y B. Mattiasson¹

¹ Department of Biotechnology, Center of Chemistry & Chemical Engineering, Lund University, P.O. Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden. E-mail: Bo.Mattiasson@biotek.lu.se

² MTM Research Centre, Örebro University, 701 82 Örebro, Sweden. E-mail: bert.vanbavel@nat.oru.se

³ Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua - Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - CIRA - UNAN, P.O. Box: 4598, Managua Nicaragua. E-mail: lacayor@ibw.com.ni and Martha.Lacayo@biotek.lu.se

⁴ Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas Fac. de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas - Universidad Mayor de San Andrés - La Paz-Bolivia. E-mail: Enrique.Terrazas@biotek.lu.se

46

Encuentro

Recibido: julio 2006 / Aceptado: octubre 2006

ESTE TRABAJO INVESTIGA LA DEGRADACIÓN DEL PLAGUICIDA toxafeno utilizando hongos producidos por la descomposición de la madera (white-rot fungus) *Bjerkandera* sp BOL13. La especie *Bjerkandera* sp BOL13 degradó el toxafeno al utilizar tres diferentes sustratos (virutas de madera, cáscara de trigo y melaza de caña) en medio líquido por un período de 38 días. Aproximadamente el 85% del toxafeno fue degradado cuando se utilizó la cáscara de trigo como sustrato principal. La producción de lignina peroxidasa (LiP) fue solamente estimulada cuando la cáscara de trigo estuvo presente en el medio líquido. Aunque la enzima xilanasa se encontró en todos los sustratos, la cáscara de trigo soportó la más alta producción de xilanasa. Una cantidad insignificante de β -glucosidasa y celulasa fueron encontradas en las muestras del medio líquido. Según la literatura, éste es el primer trabajo de investigación referente a la degradación de toxafeno con hongos *Bjerkandera* sp producidos por la descomposición de la madera.

Palabras clave: plaguicidas-investigación / lignina-biodegradación-hongos destructores de la madera

Introducción

El toxafeno es un plaguicida organoclorado integrado por una mezcla de más de 277 compuestos. Este plaguicida fue principalmente utilizado contra las plagas de insectos en los cultivos del algodón, cereales, frutas, nueces y vegetales. El uso de este compuesto ha sido de gran importancia para mejorar la productividad de la agricultura, pero la falta del conocimiento sobre su impacto ambiental produjo severa contaminación en el ambiente (Swackhamer, 1998). Durante los años 80, el uso del toxafeno fue restringido

y eventualmente prohibido en países del primer mundo. Sin embargo, muchos países en vías de desarrollo mantienen almacenadas grandes cantidades de toxafeno, DDT y otros plaguicidas. Estos plaguicidas todavía se utilizan en algunas partes del mundo (Voldner y Li, 1993). En el período de 1974 hasta 1988 fueron producidas en Nicaragua 79,000 toneladas de toxafeno (Beck, 1997). Una alternativa para los procesos convencionales de degradación bacteriológica del toxafeno consiste en el uso del hongo degradador de la lignina. Los bioreactores con hongos son ventajosos porque permiten llevar a cabo la degradación del toxafeno en una simple etapa del proceso, y los costos operacionales y de construcción son reducidos. Las enzimas como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidase (MnP) y laccase están involucradas en la biodegradación de lignina y de contaminantes orgánicos persistentes (Hatakka 1994; Pelaez *et al.*, 1995). Los hongos de madera necesitan de un sustrato fácilmente biodegradable para desencadenar la producción de enzimas extracelulares, las cuales incrementan significativamente los costos de operación. El uso de desechos de biomasa supera esta limitación al proveer un sustrato barato y confiable.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de los hongos *Bjerkandera sp* BOL13 para degradar el toxafeno en medio líquido utilizando diferentes sustratos.

Materiales y métodos

Todos los solventes orgánicos y los reactivos utilizados en los análisis eran definidos para análisis de residuos. El estándar de toxafeno fue comprado en LGC Promochem de Alemania.

Bjerkandera sp BOL13, DSM 16531 (con el número de acceso en el GenBank AY633927) creció en medio líquido, conteniendo glucosa con una concentración de 1 g l⁻¹ y extracto de levadura con una concentración de 5 g l⁻¹. Los experimentos fueron inoculados con una porción de micelio del hongo *Bjerkandera sp* de 10 mm de diámetro y fueron incubados a una temperatura de (22° C) en la oscuridad.

La composición química de los sustratos utilizados durante los experimentos se encuentra en el Cuadro 1. El contenido de cada uno de los sustratos fue de 1 g l⁻¹.

Cuadro 1. Composición de minerales y nutrientes de sustratos utilizados

Minerales y nutrientes (%)	Melazas de Caña	Virutas de Madera	Cáscara de trigo
Proteínas	-	-	3
Fósforo	0.08	-	1.6
Azúcar total	46	-	-
Celulosa	-	50	12
Hierro	0.025	-	0.014
Manganeso	0.004	-	0.01
Lignina	-	24	14

Experimentos de la degradación del toxafeno

Los experimentos se realizaron para investigar la habilidad de los hongos para degradar el toxafeno en un medio líquido con tres diferentes fuentes de carbono. El toxafeno fue agregado en cada frasco de vidrio (600 μ l) de la solución patrón de toxafeno (1 g l⁻¹). También se adicionó a los frascos una alícuota de 30 ml de medio de cultivo y las virutas de madera, cáscara de trigo y melaza de caña a una concentración de 1 g l⁻¹ .y. Posteriormente, los frascos se inocularon con 10 mm de diámetro del hongo *Bjerkandera sp.*, que habían crecido previamente en platos petri conteniendo levadura. Dos grupos de control fueron preparados: uno contenía el medio de cultivo y el toxafeno; y el otro contenía el medio de cultivo y los hongos, sin el toxafeno. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los frascos fueron incubados a temperatura ambiente en la oscuridad en condiciones estériles.

Métodos analíticos

48

Las muestras fueron captadas cada cuatro días por un período de 38 días. Los análisis que se llevaron a cabo durante todo el experimento fueron: demanda química de oxígeno (DQO), Cl, NO⁻³, NH⁺⁴, pH, celulasa, β -glucosidasa, xilanasa, MnP, LiP, lacasa, toxafeno total y los isómeros del toxafeno (Cuadro 2).

Cuadro 2. Isómeros estudiados de toxafeno. El sistema de nomenclatura utilizado fue el de Parlar como el que se describe en Burhenne *et al.*, 1993.

Compuesto	Nombre químico (IUPAC)
P11	2,2,3-exo,8,9,10-hexaclorocanfeno
P12	2-exo,3-endo,8,8,9,10-hexaclorocanfeno
P15	2-exo,3-endo,7,8,9,10-hexaclorocanfeno
P31	2,2,3-exo,8,8,10,10-octaclorocanfeno
P32	2,2,5-endo,6-exo,8,9,10-heptaclorobornano
P39	2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-octaclorobornano
P40	2,endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10,10-octaclorobornano
P41	2,exo,3-endo,5-exo,6-exo,8,9,9,10,10-octaclorobornano
P42	2,2,5-endo,6-exo,8,8,9,10-octaclorobornano Y 2,2,5-endo,6-exo,8,9,9,10-octaclorobornano
P44	2,-exo,5,5,8,9,9,10-octaclorobornano
P50	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-nonaclorobornano
P58	2,2,3-exo,5,5,8,9,10,10-nonaclorobornano
P59	2,2,5-endo,6-exo,8b,8c,9c,10a,10b-nonaclorobornano
P63	2-exo,3-endo,5-endo,6-exo,8,9,9,10,10-nonaclorobornano
P69	2,2,5,5,,6-exo,8,9,9,10,10-decaclorobornano

La DQO fue determinada utilizando el Standard Métodos (Standard Métodos para la el examen de agua y aguas de desecho 1999). Los Cloruros, NO^{-3} y NH^{+4} fueron analizados utilizando el equipo FIAStar 5000 (FOSS TECATOR AB).

Análisis de Toxafeno

El análisis de toxafeno fue realizado utilizando cartuchos C_{18} (Supelco Park, Bellefonte, PA., USA). Los cartuchos fueron condicionados con hexano, acetona, metanol y agua respectivamente. Se agregó la muestra de agua; cuando el agua fue eluída, se incrementó el vacío por un período de 10 a 15 minutos, hasta que la columna quedara completamente seca. El toxafeno fue eluído con hexano. El toxafeno total fue analizado por CG-ECD. Los isómeros del toxafeno y la confirmación del toxafeno total fueron analizados por GC/MS, de acuerdo a investigaciones realizadas con anterioridad por Lacayo *et al.*, 2004.

Enzimas ligninolíticas

La enzima Manganese peroxidasa (MnP) se midió utilizando el método de acuerdo a Castillo *et al.*, 1994. La actividad de la enzima lacasa fue medida utilizando la metodología descrita por Wolfenden y Wilson, 1982. La lignina peroxidasa (LiP) fue medida con la metodología descrita por Bampus *et al.*, 1985.

Enzimas celulolítica y xilanolítica (β -glucosidasa, celulasa y xilanasa)

Los sustratos para la determinación de xilanasa, β -glucosidasa y celulasa fueron xilano 0.1 % (w/v), p-nitrofenil- β -D-glucopiranosida (PNPG) 0.02% (w/v) y papel filtro en tiras de 0.5x2.5 cm, respectivamente. Para los análisis de β -glucosidasa y celulasa, la reacción fue llevada a cabo en 1 ml de citrato con una concentración de 50 mM y con un pH de 4.8. La xilanasa fue determinada utilizando 200 mM de fosfato con un pH 6. En todos los casos, 0.5 ml de sustrato fue agregado al blanco, al control y a la muestra. Para determinar la actividad de la enzima, 0.5 ml de la muestra fue también agregado a la mezcla de reacción. Los tubos fueron incubados a 50°C por 60 minutos en un baño de agua. Después de la incubación, 3ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) fueron agregados a todos los tubos. Después, los tubos fueron hervidos a 100°C por 10 minutos y fueron agregados 5 ml de agua ultra pura. Luego de dejarlos enfriar a temperatura ambiente, los tubos fueron agitados vigorosamente por 30 segundos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm (Miller, 1959).

Resultados y discusión

Los hongos *Bjerkandera* sp BOL13 fueron capaces de crecer con los sustratos utilizados (virutas de madera, cáscara de trigo y melaza de caña), habiendo sobrevivido en condiciones tóxicas con el toxafeno. Un resumen de los resultados se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentaje de toxafeno total y los isómeros degradados en lotes de cultivos con los hongos *Bjerkandera* sp BOL13 en presencia de diferentes sustratos

Toxafeno analizado	Cáscara de trigo	Melaza de caña	Virutas de madera
Toxafeno total ^b	85	49	52
Isómeros del toxafeno ^c			
P-11	70	57.5	44.5
P-12	70	43	52.3
P-15	73.5	60.4	42.4
P-32	53.6	50	59.3
P-31	82.2	62	53
P-39	75	62	57
P-40	73	58	60
P-41/42	78.3	50.2	63.8
P-44	72.3	58.4	48
P-50	85	52.3	70.3
P-69	82	77	77

^aEl experimento se realizó durante un período de 38 días. Los valores corresponden al resultado mayor de remoción, después de 30 días de incubación con *Bjerkandera* sp BOL13. Los datos fueron analizados por dos vías ANOVA ($p = 0.05$). En el control abiótico no se detectó eliminación de los compuestos estudiados.

^bEl toxafeno total fue determinado utilizando Cromatografía de Gases con detector de captura de electrones.

^cLos isómeros del toxafeno fueron analizados por GC/MS-NCI.

Aproximadamente el 85% del toxafeno total fue degradado después de 30 días de incubación con la *Bjerkandera* sp BOL13. Todos los isómeros estudiados fueron susceptibles a los hongos, aunque el isómero P32 resultó más recalcitrante, ya que solamente se removió el 53%. Los isómeros que contienen más átomos de Cloro en sus moléculas fueron mas susceptibles a la oxidación (ilustración 1).

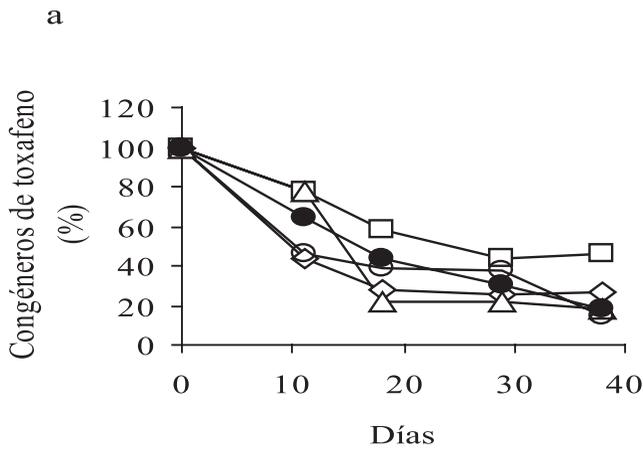


Ilustración 1. Degradación del toxafeno por la especie *Bjerkandera* sp BOL13 con cáscara de trigo (a). Los isómeros son representados por símbolos: P11 representado por rombos, P32 por cuadrados, P31 por triángulos, P50 por círculos abiertos y P69 por círculos negros. La degradación del toxafeno fue seguida durante 38 días de incubación. Los valores graficados representan los valores medios de los datos obtenidos de los lotes de cultivos realizados por duplicado.

Cuando fueron utilizados los sustratos virutas de madera o melaza de caña de azúcar la degradación del toxafeno claramente disminuyó en comparación con la cáscara de trigo. El 52% y el 49% del toxafeno total fueron removidos con virutas de madera y melaza de caña, respectivamente. La degradación del toxafeno con el tiempo mostró que los isómeros P11 y P15 fueron removidos en un 44.5% y 42.4% respectivamente cuando las virutas de madera fueron utilizadas como fuente de carbono (ilustración 2).

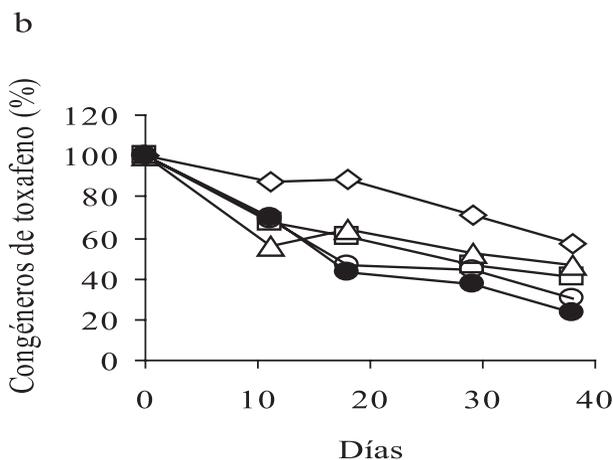
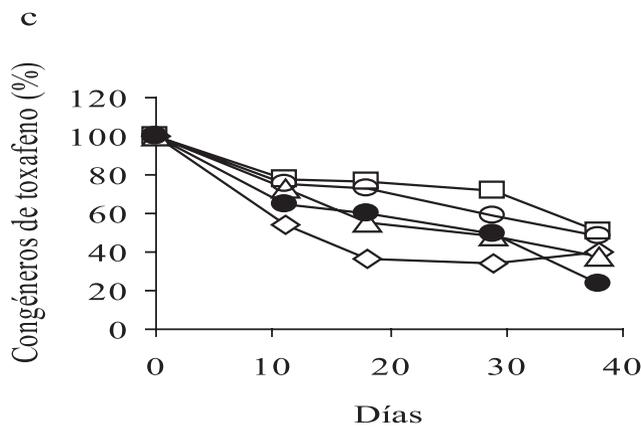


Ilustración 2. Degradación del toxafeno por la especie *Bjerkandera* sp BOL13 con virutas de madera (b) y (c) melazas de caña. Los isómeros son representados por símbolos: P11

representado por rombos, P32 por cuadrados, P31 por triángulos, P50 por círculos abiertos y P69 por círculos negros. La degradación del toxafeno fue seguida durante 38 días de incubación. Los valores graficados representan los valores medios de los datos obtenidos de los lotes de cultivos realizados por duplicado.

Los isómeros altamente clorados, P50 y P69 fueron más susceptibles a la degradación por los hongos *Bjerkandera* sp BOL13, ya que el 70% y 77% de estos isómeros fueron removidos. La degradación del toxafeno no presentó diferencias significativas cuando se utilizaron melazas de caña como sustrato, en comparación con los resultados obtenidos cuando se usaron virutas de madera. Sin embargo los isómeros P12 y P50 fueron más recalcitrantes (ilustración 3).



52

Ilustración 3. Degradación del toxafeno por la especie *Bjerkandera* sp BOL13 con melazas de caña (c). Los isómeros son representados por símbolos: P11 representado por rombos, P32 por cuadrados, P31 por triángulos, P50 por círculos abiertos y P69 por círculos negros. La degradación del toxafeno fue seguida durante 38 días de incubación. Los valores graficados representan los valores medios de los datos obtenidos de los lotes de cultivos realizados por duplicado.

La oxidación del toxafeno fue asociada con la producción de la enzima LiP por el hongo *Bjerkandera* BOL13. Aproximadamente 70 U l⁻¹ de actividad enzimática fue registrada cuando se utilizó la cáscara de trigo como sustrato principal. Sin embargo, se detectaron valores bajos de actividad enzimática cuando se utilizaron los sustratos virutas de madera o melazas de caña (ilustración 4A).

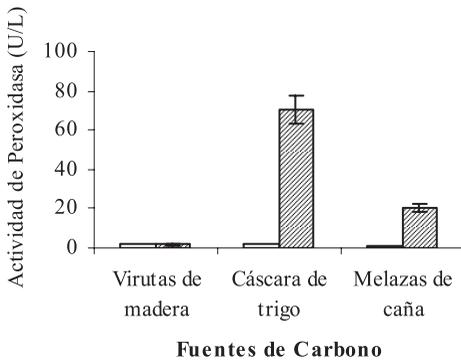


Ilustración 4A

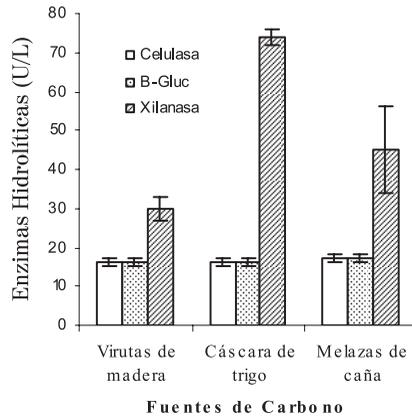


Ilustración 4B

Cuando se usó cáscara de trigo como sustrato para la degradación del toxafeno, se detectó una actividad significativa de la enzima xilanasa. Después de 25 días de crecimiento de los hongos *Bjerkandera* BOL13, se registró una actividad enzimática de 74 U l-1. Se registró baja actividad de la xilanasa cuando se utilizaron virutas de madera o melaza de caña (ilustración 4B).

Las enzimas b-glucosidasa y la celulasa también fueron detectadas en el cultivo de los hongos. Cuando los tres sustratos fueron investigados, la actividad fue muy baja.

La demanda química de oxígeno disminuyó con los tres sustratos. Sin embargo, la reducción mas evidente se observó cuando se suministraron las melazas de caña al medio de cultivo. La producción de CO₂ se incrementó cuando la cáscara de trigo se utilizó como sustrato principal. Cuando las virutas de madera y las melazas de caña se utilizaron como sustrato, la producción del CO₂ fue no significativa. Las concentraciones de los cloruros se mantuvieron constantes con todos los sustratos estudiados durante todo el período de la investigación (Cuadro 4). En los controles abióticos no se registró ningún cambio en los parámetros estudiados de COD, CO₂ y Cl⁻.

Cuadro 4. Resultados de la oxidación de los sustratos mineralización y cloruros en cultivos de *Bjerkandera* sp de BOL13

Sustratos	COD ^a mg l ⁻¹	CO ₂ %	Cloruros ^b mg l ⁻¹	pH
Cáscara de trigo	333±45	30±7	140±19	5±1
Virutas de madera	216±30	2±1	145±15	5±0.5
Melazas de caña	166±19	5±3	160±12	5±0.5

^aAl inicio del experimento, la demanda química de Oxígeno fue de 0.6 g l⁻¹ para la cáscara de trigo, 1 g l⁻¹ para las virutas de madera y 0.7 g l⁻¹ para la melaza de caña.

^bLa concentración inicial de cloruro fue de 150 mg l⁻¹.

54

Discusión

Los sustratos utilizados (cáscara de trigo, virutas de madera y melaza de caña) suministran sustratos baratos y eficientes para la degradación del toxafeno. Los resultados mostraron que el uso de la cáscara de trigo fue más efectivo en la eliminación del toxafeno que las virutas de madera y la melaza de caña. Se observaron porcentajes de degradación mayores del 85% en el sistema en donde se utilizaron las cáscaras de trigo (Cuadro 3). Esto puede ser explicado como un resultado en las diferencias de la composición química (rica en celulosa, proteínas y minerales, Cuadro 1). El hecho de que el toxafeno total y los isómeros fueron degradados sugiere que ellos estuvieron disponibles para los hongos.

Los isómeros que contienen más átomos de cloro fueron más susceptibles a la degradación del toxafeno. Efectivamente, el isómero P69 fue removido con las tres diferentes fuentes de carbono utilizadas. Sin embargo, cuando los hongos crecieron en las virutas de madera y en las melazas de caña, la eliminación de los isómeros con menos átomos de cloro fue menos efectiva si se compara con la cáscara de trigo (Cuadro 3).

Una actividad significativa de LiP fue encontrada en el cultivo de hongos conteniendo la cáscara de trigo. Probablemente, la alta concentración de manganeso en la composición química de la cáscara de trigo fue determinante para inducir la producción de LiP en los hongos. En la literatura ha sido reportado que el sistema LiP/H₂O₂ producido por algunas especies de *Bjerkandera* es responsable para la oxidación de tintes y compuestos recalcitrantes. Cuando las virutas de madera se utilizaron como sustrato en los cultivos con los hongos, se encontraron muy bajas actividades de la LiP y MnP. Esto pudiera ser porque las enzimas ligninolíticas son mejor estimuladas en medios ricos en nitrógeno que en medios que contienen solamente lignina (Kotterman *et al.*, 1996).

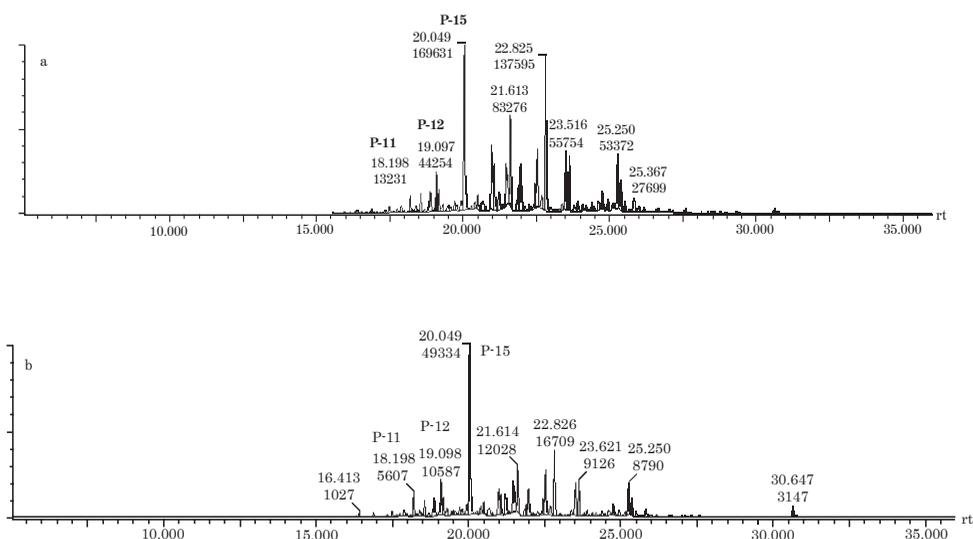
La eliminación de compuestos recalcitrantes no está siempre relacionada a las enzimas peroxidasas, ya que otras especies de oxígeno reactivo pueden ser producidas por los hongos (Soares *et al.*, 2005). Las melazas de caña no estuvieron disponibles para la degradación del toxafeno.

De hecho, solamente el 49% del toxafeno total fue reducido en los cultivos de los hongos con melaza de caña como fuente de carbono. Sin embargo, el grado de degradación fue específico para este isómero. En cuanto a la actividad de las enzimas LiP y la MnP, tampoco fueron inducidas cuando se usó la melaza de la caña. La concentración de la sucrosa en la melaza de caña era relativamente alta y se conoce que la cantidad de azúcar en el sustrato es un factor determinante en la regulación de las enzimas ligninolíticas por la represión catabólica en los hongos.

También se estudiaron las enzimas de hidrolización de la celulosa y del xilano. La xilanasa fue significativamente inducida por los tres sustratos utilizados en el estudio. La cáscara del trigo indujo una actividad de la xilanasa de 74 U l⁻¹ comparados con 30 o 45 U l⁻¹ alcanzado con las virutas de madera o la melaza de caña, respectivamente. En la literatura se ha encontrado que el género *Bjerkandera* produce la enzima xilanasa (Koker *et al.*, 2000). La alta actividad de la enzima xilanasa encontrada se relaciona con la concentración alta de la enzima LiP, de este modo, el producto de xilanasas podría ser una fuente de H₂O₂ (Cameron *et al.*, 2000). No se detectaron cantidades significativas de b-glucosidasa o de celulasa cuando se utilizaron los sustratos en estudio.

La DQO disminuyó en los cultivos en lote con los tres sustratos utilizados en el estudio. Cuando se usó la cáscara de trigo como sustrato, la DQO disminuyó significativamente en los medios de cultivo después de 38 días. Fue correlacionado bien con la producción del CO₂ y la degradación del toxafeno utilizando la de trigo como sustrato. No se registró ninguna producción del CO₂ con la viruta de madera o la melaza de caña. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la concentración del toxafeno. La DQO y el CO₂ fueron buenos indicadores de la actividad metabólica de los hongos.

En todos los casos, las concentraciones del cloruro fueron constantes durante la oxidación del toxafeno. Esto se podría explicar porque la especie de los hongos *Bjerkandera* puede también catalizar la reacción de clorinación de compuestos aromáticos (Swarts *et al.*, 1998). Así, cuando el toxafeno se oxidó, los átomos de los cloruros pudieran ser liberados al medio y pudieran ser rápidamente utilizados por los hongos para clorar otras moléculas (Ilustración 5). Esta situación se debe tomar en consideración como el producto transformado podría ser aún más tóxico que el compuesto original (Lacayo *et al.* 2004).



56

Ilustración 5. Cromatogramas de los isómeros del toxafeno analizados y metabolitos no identificados obtenidos en lotes de cultivo con *Bjerkandera* sp BOL13, después de 30 días de incubación. (a) Isómeros del toxafeno en los controles abióticos preparados con cáscara de trigo y sin hongos. (b) Isómeros de toxafeno en los medios de cultivos preparados con cáscara de trigo e inoculados con hongos *Bjerkandera* sp BOL13.

Leyendas: P-11, P-12 y P-15: Designación de los compuestos. El sistema de nomenclatura utilizado fue el de Parlar como el descrito en Burhenne *et al.*, 1993 (Cuadro 3).
rt: tiempo de retención

Los números que están encima de cada tiempo de retención son las áreas detectadas de los compuestos estudiados.

Conclusión

La degradación del toxafeno se logró al utilizar la especie de hongos *Bjerkandera* sp strain BOL13, proporcionando de esta forma un método rentable para la degradación del toxafeno debido al bajo costo de los sustratos utilizados. Sin embargo, deben realizarse otros estudios para clarificar los mecanismos verdaderos que realizan durante la degradación de compuestos orgánicos persistentes. Además, deben realizarse algunas pruebas de toxicidad antes de aplicarlos en casos reales •

Referencias bibliográficas

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater 20th ed.* American Water Works Association, and Water Environment Federation, Washington Dc, USA
- BAMPUS, J. A. *et al.*, (1985). "Oxidation of persistent environmental pollutants by a white

rot fungus”, *Science* 228: 1434-1436.

-BECK, I. M., (1997). “Factores que influyen en el uso de plaguicidas en Nicaragua. In: Memorias del Congreso Nacional Sobre Impacto de los Plaguicidas en Ambiente, Salud, Trabajo y Agricultura”, Managua, Nicaragua, OPS-OMS, pág 20-30.

-BURHENNE, J. *et al.*, (1993). “Preparation and structure of high-chlorinated bornane derivatives for the quantification of toxaphene residues in environmental samples”, *Fresenius J Anal Chem* 346: 779-785. USA.

-CAMERON, M. D. *et al.*, (2000). “Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compound and xenobiotics”, *Appl Microbiol Biotechnol* 54:751-758. USA.

-CASTILLO, M. P. *et al.*, (1994). “Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid”, *Anal Biochem* 218: 399-404.

-HATAKKA, A., (1994). “The bio-reactor project 1994-95 lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation”, *FEMS Microbiol Rev* 13: 125-135.

-KOKER, T. H. *et al.*, (2000). “Isolation and enzymatic characterization of South african white-rot fungi”, *Mycol Res* 104(7): 820-824.

-KOTTERMAN, M. J. *et al.*, (1996). “Hydrogen peroxide production as a limiting factor in xenobiotic compound oxidation by nitrogen-sufficient cultures of *Bjerkandera* sp. strain BOS55 overproducing peroxidases” *Appl Environ Microbiol* 62: 880-885.

-LACAYO, M. L. *et al.*, (2004). “Degradation of toxaphene in water during anaerobic and aerobic conditions”, *Env Poll* 30: 437-443.

-MILLER, G. L. (1959). “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reduction sugar” *Anal Chem* 31(3): 426-428.

-PELAEZ, F. *et al.*, (1995). “Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation” *Mycol Resources* 99 (1): 37-42.

-SOARES, A. *et al.*, (2005). “The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol”, *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 719-725.

-SWACKHAMER, D. L. *et al.*, (1998). “Toxaphene in the great lakes”, *Chemosphere* 37(9/12): 2545-2561.

-SWARTS, H. *et al.*, (1998). “Identificaton and synthesis of novel chlorinated p-anisylpropanoid metabolites from *Bjerkandera* species”, *J Nat Prod* 61: 1110-1114.

-VOLDNER, E. C. y LI, Y. F. (1993). “Global usage of toxaphene”, *Chemosphere* 27(10): 2073-2078.

-WOLFENDEN, B. S. y WILSON, R. L. (1982). “Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenthiazoline-6-sulphonate)”, *J Chem Soc Perkin transitions II*: 805-812.